



VNIVERSITAT Æ VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Biología Celular y Parasitología

Programa de Neurociencias Básicas y Aplicadas

INHIBIDORES ATÍPICOS DEL TRANSPORTE DE DOPAMINA: POSIBLES AGENTES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A LOS ESTIMULANTES.

Clara Velázquez Sánchez

Dirigida por el Dr. Juan José Canales Conejero

Tutor: Dr. Carlos López García

Valencia 2013

El Dr. Juan José Canales Conejero, profesor en Behavioural Neuroscience del Departamento de Psicología de la Universidad de Canterbury (Nueva Zelanda),

INFORMA,

Que el trabajo titulado “INHIBIDORES ATÍPICOS DEL TRANSPORTE DE DOPAMINA: POSIBLES AGENTES TERAPÉUTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A LOS ESTIMULANTES” ha sido realizado por D^a. Clara Velázquez Sánchez, bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste, y a efectos oportunos, firmo el presente informe.



14 de Noviembre 2012

Juan José Canales Conejero

Yo, Clara Velázquez Sánchez, declaro que soy autora del presente trabajo de investigación y que lo he realizado en el laboratorio de Biopsicología y Neurociencia Comparada, bajo la dirección del Dr. Juan José Canales Conejero.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente documento en Valencia, a 17 de Diciembre de 2012.

Clara Velázquez Sánchez

La presente Tesis ha sido financiada con un contrato predoctoral de la Red de Trastornos Adictivos (RDo6/0001/0032 RETICS, Instituto de Salud Carlos III), y con fondos del Plan Nacional de Biomedicina (Ministerio de Ciencia e Innovación), Plan Nacional sobre Drogas (PNSD2008-057, Ministerio de Sanidad y Consumo), Fondo de Investigaciones Sanitarias (Ministerio de Sanidad) y FEPAD (Fundación para el Estudio y Prevención de las Adicciones y Drogodependencias), en los que figuran el Dr. Juan José Canales como investigador principal y Clara Velázquez Sánchez como investigadora asociada.

Agradecimientos

Agradecer a todas las personas que durante estos seis años han colaborado de alguna forma en este trabajo no es fácil. Y no es porque no sepa qué decir, es porque durante todo este tiempo sois muchos los que de alguna manera habéis hecho que esto sea ahora una realidad.

Gracias Juanjo por haberme dado la oportunidad de conocer este mundo. Desde el principio me abriste las puertas de tu laboratorio, poco a poco fui aprendiendo y aunque el trayecto no siempre ha sido fácil, juntos hemos llegado al final. Ahora que tengo que seguir sola, intentaré recordar todo lo aprendido, todos los consejos que durante este tiempo me has dado y sé que en el futuro podré contar contigo.

Gracias Verdugo por haberme ofrecido siempre tu ayuda. No era parte de tu equipo pero de alguna manera siempre he sentido que formaba parte de él.

Sin ninguna duda los largos días de experimentos no habrían sido lo mismo sin todas las personas que habitábamos el semisótano del Instituto Cavanilles. Gracias Vite por todos los momentos que hemos compartido, que no son pocos, y porque sé que estemos donde estemos y pase lo que pase siempre estarás ahí. Gracias Alex y gracias Águeda por toda la ayuda recibida durante este tiempo y por todos esos momentos de radio y risas (Cadena 100 y los 40 Principales son, sin duda, la banda sonora de esta tesis). Gracias Laura por todo lo que me enseñaste al principio cuando era todavía una estudiante y mis conocimientos “de bancada” eran bastante nulos. Gracias Irene y gracias Vivian por todos los momentos que hemos pasado juntas tanto dentro como fuera del *lab*, por todos aquellos martes locos que fueron tantos que no se si los podría recordar todos. Gracias Mario, Patri, Susana, Clara (la rubia), María, Sandra, Sara, Melissa y Miriam porque aunque laboralmente no hayamos compartido tanto, en el día a día hemos compartido mucho.

Thank you to all the people from the University of Canterbury. Thank you Neville for allowing me to stay in the Level 5 and for all the facilities that you gave to me being there. Thank you John DA for all your interest and support. Thanks Neroli, Silvana and Emma for all your patience and for teaching me another way to work (with rules). Thanks Rachel, James and Kyle for showing me the “kiwi culture” which is now not so far. And thank you Jenelle, Gary, Aliette, Ryan, Megan and Hannah for made in many moments everything much easier.

Gracias Toni. Ahora sí que me quedo sin palabras. No se como expresar todo lo que hemos vivido y vivimos juntos. Juntos empezamos esto y juntos lo terminamos. En todos estos años me has visto reir, llorar, aprender y madurar en muchos aspectos que no tienen que ver únicamente con el trabajo. Creo que con nadie he compartido tanto como comparto contigo. Gracias por todo, pero sobretodo por estar siempre aquí al lado.

Gracias Silvia, Raquel, Tere y Mariajo por haber oído tantas veces “este fin de semana yo no puedo”, por entenderlo y porque a pesar de que seguimos caminos diferentes siempre se cruzan.

Gracias Cris por todos esos fines de semana en los que, aunque tu idea era la de jugar con los gatos, ibas conmigo al laboratorio a hacerme compañía. Pero sobretodo gracias porque sin darte cuenta, aún estando cada una en una punta del mundo (literalmente), me has transmitido esa fuerza y constancia que ahora te caracterizan y porque aunque no lo creas para mi eres un ejemplo a seguir.

Y los más importantes porque sin ellos puede que no estuviera escribiendo esto, gracias a mis padres. Gracias por todo el apoyo que me habéis dado, por todo lo que habéis aguantado y hasta sufrido sobretodo en este último año. Gracias por respetar en aquel momento mi decisión de querer empezar una carrera científica aún sabiendo que no era ni es una tarea fácil y gracias ahora por respetar el que la quiera continuar con todo lo que ello conlleva.

Valencia, 23 de septiembre de 2012

A mis padres

A Cris

Índice

INTRODUCCIÓN	1.
1.-NEUROFARMACOLOGÍA DE LA ADICCIÓN A ESTIMULANTES	1.
1.1- CONSUMO, ABUSO Y DEPENDENCIA.	1.
1.2- TRANSICIÓN DESDE UN CONSUMO OCASIONAL A LA ADICCIÓN: PATRONES DE CONSUMO EN MODELOS ANIMALES.	3.
1.3- DROGAS ESTIMULANTES.	6.
1.3.1. Cocaína	7.
1.3.2. Anfetamina	8.
1.3.3. Efectos farmacológicos	8.
1.3.4. Tolerancia	10.
1.3.5. Sensibilización	11.
1.4- VÍAS NEUROBIOLÓGICAS DE LA ADICCIÓN Y PAPEL DE LA DOPAMINA.	13.
1.4.1. Receptores D1	16.
1.4.2. Receptores D2	16.
1.5- OTROS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES MODULADORES DEL SISTEMA MESOLÍMBICO IMPLICADOS EN EL REFUERZO Y LA MOTIVACIÓN.	22.
1.5.1. Ácido gamma-amino butírico	22.
1.5.2. Opioides	22.
1.5.3. Glutamato	23.

2.- FARMACOTERAPIA DE LA ADICCIÓN A ESTIMULANTES**25.****2.1- MEDICACIONES EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA
DEPENDENCIA A LA COCAÍNA. 25.****2.1.1. Agentes GABA 26.**

Topiramato 26.

Baclofén 27.

Vigabatrina 27.

Tiagabina 28.

2.1.2 Agentes dopaminérgicos 28.

Bupropión 28.

Antagonistas y agonistas dopaminérgicos parciales 29.

Levodopa/Carbidopa 30.

2.1.3. Medicaciones sustitutivas 30.

Metilfenidato 32.

Modafinil 33.

Disulfirán 34.

d-Anfetamina 35.

Formulaciones orales de cocaína 35.

2.1.4. Otros compuestos en fase de ensayo clínico 36.

Vacunas 36.

N-acetil cisteína 37.

Ondarsetrón 37.

**2.2- MEDICACIONES EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA
DEPENDENCIA A LA ANFETAMINA. 38.****2.3- DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS MEDICACIONES EN
FASE PRECLÍNICA. 40.**

3.-INHIBIDORES ATÍPICOS DE LA CAPTURA DE DOPAMINA: ANÁLOGOS DE LA BENZOTROPINA 42.

3.1- EL TRANSPORTADOR COMO TARJETA FARMACOLÓGICA DE SUSTANCIAS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO EN EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A PSICOESTIMULANTES: INHIBIDORES ATÍPICOS DE LA RECAPTURA DE DOPAMINA. 42

3.2- ESTUDIOS COMPORTAMENTALES. 47.

3.2.1. Actividad locomotora 47.

3.2.2. Discriminación 50.

3.2.3. Autoadministración 51.

3.2.4. Preferencia de lugar condicionada 55.

3.3- ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS. 57.

3.4- EFECTOS IN VIVO VS. EFECTOS IN VITRO. 59.

3.5- ESTUDIOS MOLECULARES. 60.

3.6- ACCIÓN SOBRE OTRAS DIANAS. 63.

3.6.1. Actividad antagonista sobre receptores histamínicos 63.

3.6.2. Actividad antagonista sobre receptores muscarínicos 64.

3.6.3. Implicación de otros receptores 67.

3.7- CONCLUSIÓN. 69.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 71.

RESULTADOS 75.

1.- EL INHIBIDOR DE LA CAPTURA DE DOPAMINA, AHN 1-055, REDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES DE ACTIVACIÓN TEMPRANA, LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y LA RECOMPENSA INDUCIDA POR LA COCAÍNA. 77.

2.- EL INHIBIDOR DE LA CAPTURA DE DOPAMINA, JHW 007, BLOQUEA LA RECOMPENSA, LA ESTIMULACIÓN LOCOMOTORA Y LA SENSIBILIZACIÓN INDUCIDA POR LA COCAÍNA. 80.

3.- PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE UN INHIBIDOR DE LA CAPTURA DE DOPAMINA EN MODELOS ANIMALES DE ADICCIÓN A LA ANFETAMINA. 83.

4.- UN INHIBIDOR ATÍPICO DE LA CAPTURA DE LA DA PREVIENE LA SENSIBILIZACIÓN Y REORGANIZACIÓN SINÁPTICA INDUCIDA POR ANFETAMINA. 86.

DISCUSIÓN 89.

CONCLUSIONES 103.

REFERENCIAS 109.

ANEXO 153.

PUBLICACIONES COMO PRIMERA AUTORA QUE FORMAN PARTE DE ESTA TESIS

ARTÍCULO 1 155.

“THE DOPAMINE UPTAKE INHIBITOR 3 α -[BIS(4'-FLUOROPHENYL) METOXY]-TROPANE REDUCES COCAINE-INDUCED EARLY-GENE EXPRESSION, LOCOMOTOR ACTIVITY, AND CONDITIONED REWARD”. VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ C, FERRAGUD A, HERNÁNDEZ-RABAZA V, NÁCHER A, MERINO V, CARDÁ M, MURGA J, CANALES JJ (2009). NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 34, 2497–2507

ARTÍCULO 2

165.

“THE HIGH AFFINITY DOPAMINE UPTAKE INHIBITOR, JHW 007, BLOCKS COCAINE-INDUCED REWARD, LOCOMOTOR STIMULATION AND SENSITIZATION”. VELÁZQUEZ-SÁNCHEZ C, FERRAGUD A, MURGA J, CARDÁ M, CANALES JJ (2010). EUROPEAN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 20, 501–508

ARTÍCULO 3

173.

“THERAPEUTIC-LIKE PROPERTIES OF A DOPAMINE UPTAKE INHIBITOR IN ANIMAL MODELS OF AMPHETAMINE ADDICTION”. VELAZQUEZ-SANCHEZ C, FERRAGUD A, RENAU-PIQUERAS J, CANALES JJ (2010). INTERNATIONAL JOURNAL OF NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY 14, 655-65

ARTÍCULO 4

185.

“THE ATYPICAL DOPAMINE TRANSPORT INHIBITOR, JHW 007, PREVENTS AMPHETAMINE-INDUCED SENSITIZATION AND SYNAPTIC REORGANIZATION WITHIN THE NUCLEUS ACCUMBENS”. VELAZQUEZ-SANCHEZ C, GARCÍA-VERDUGO JM, MURGA J, CANALES JJ (2013). PROGRESS IN NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY & BIOLOGICAL PSYCHIATRY. DOI:10.1016/J.PNPBP.2013.01.016.

PARTICIPACIÓN EN OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS 219.

CAPÍTULOS EN LIBROS

221.

Índice de figuras

Figura 1.- Mecanismo de acción de la cocaína.	7.
Figura 2.- Mecanismo de acción de la anfetamina.	9.
Figura 3.- Estructuras clave y conexiones implicadas en el proceso adictivo.	18.
Figura 4.- Áreas cerebrales de interacción entre las sustancias de abuso y el sistema mesolímbico dopaminérgico y sus moduladores clave.	21.
Figura 5.- Estructura química de las moléculas de cocaína, BZT y GBR 12909.	44.
Figura 6.-Cámara operante para la autoadministración de drogas.	52.
Figura 7.- Aparato utilizado para los ensayos de preferencia de lugar condicionada.	56.

Índice de tablas

Tabla 1.- Definiciones relacionadas con el proceso adictivo.	2.
Tabla 2.- Modelos animales de laboratorio en diferentes etapas del proceso adictivo.	4.
Tabla 3.- Ensayos clínicos controlados con potenciales agentes terapéuticos en pacientes adictos a la cocaína y/o metanfetamina.	31.
Tabla 4.- Datos de binding de los análogos de la BZT sobre el DAT, SERT, NET, M1 y H1.	46.

Abreviaturas

5-HT	Serotonina
ACTH	Corticotropina
ADHD	Trastorno de hiperactividad y déficit de atención
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ATV	Área tegmental ventral
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BZT	Benzotropina
COF	Corteza orbitofrontal
CP	Corteza prefrontal
CPP	Preferencia de lugar condicionada
CREB	cAMP response element binding protein
CRF	Factor liberador de corticotropina
DA	Dopamina
DAT	Transportador de dopamina
DD	Discriminación de drogas
DL	Dorsolateral
DM	Dorsomedial
DOR	Receptor delta
DSM	Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales
EPM	Laberinto en cruz elevada
FDA	Agencia de Drogas y Medicamentos
FR	Razón fija

GABA	Ácido gamma amino butírico
i.p.	Intraperitoneal
KOR	Receptor kappa
ME	Microscopía electrónica
MSN	Neuronas espinosas medianas
MOR	Receptor mu opioide
NA	Noradrenalina / Norepinefrina
NAc	Núcleo Accumbens
NET	Transportador de noradrenalina
NMDA	N-metil-D-aspartato
PR	Razón progresiva
SA	Autoadministración
SERT	Transportador de serotonina

Resumen

La adicción a psicoestimulantes es en la actualidad un fenómeno de gran importancia tanto desde el punto de vista clínico como social. Las consecuencias negativas que se derivan del consumo de estas sustancias son significativas, incluyendo problemas médicos, psicosociales y laborales. Asimismo el abuso de drogas se relaciona con tasas incrementadas de crimen y violencia. Según el último informe emitido por el Observatorio Europeo de las Drogas y Toxicomanías, el consumo de anfetaminas se ha mantenido estable en la mayoría de los países de la Unión Europea, mientras que el nivel de consumo de cocaína durante este último año se encuentra por encima de la media en países como Irlanda, Chipre, Reino Unido y España (EMCDDA, 2011), un hecho preocupante que debería tener reflejo en un mayor esfuerzo investigador de cara a identificar y evaluar mecanismos preventivos y terapéuticos que ayuden a mitigar esta enfermedad.

El transportador de dopamina (DAT) es actualmente una de las dianas terapéuticas más prometedoras para el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes. Diferentes estudios han demostrado que la cocaína, anfetamina y metanfetamina ejercen fuerte estimulación y efectos eufóricos debido principalmente a la interferencia con el DAT. La cocaína bloquea el transportador, previene la captura de dopamina (DA) por las terminales nerviosas e incrementa los niveles extracelulares de este neurotransmisor en el espacio sináptico. Por su parte, la anfetamina y metanfetamina producen grandes elevaciones de DA en el espacio extracelular debido a su liberación desde las vesículas donde se almacena y a la reversión del transporte a través del DAT.

La búsqueda de nuevas medicaciones para el tratamiento de la adicción se ha centrado en la identificación de sustancias que actúen como sustitutos de la droga estimulante produciendo efectos similares en la transmisión

dopaminérgica y/o ejerciendo acciones antagonistas que impidan la unión al DAT. La mayoría de los esfuerzos se han centrado en el diseño de moléculas que mimeticen la unión al transportador pero con un menor efecto estimulante y una acción farmacológica más duradera.

En el presente proyecto de tesis se han caracterizado los posibles efectos terapéuticos de dos análogos derivados de la benzotropina (BZT), el AHN 1-055 y el JHW 007. Estas moléculas se caracterizan por tener una alta afinidad por el DAT y una pauta lenta y duradera de acción farmacológica. Para llevar a cabo el trabajo administramos cada uno de los análogos en combinación con cocaína o anfetamina empleando diferentes modelos animales de adicción a psicoestimulantes tales como actividad locomotora, sensibilización, preferencia de lugar condicionada (CPP) y autoadministración (SA), acompañados de técnicas histoquímicas. Los resultados de estos ensayos revelaron que ambos análogos no se comportan como estimulantes clásicos, si no que atenúan o bloquean completamente algunos de los efectos, tanto comportamentales como neurobiológicos inducidos por las drogas, apoyando la hipótesis de que pueden ser moléculas apropiadas para el tratamiento de la adicción a los psicoestimulantes.

Introducción

1.-NEUROFARMACOLOGÍA DE LA ADICCIÓN A ESTIMULANTES

1.1- CONSUMO, ABUSO Y DEPENDENCIA.

La adicción a las drogas se ha descrito como un trastorno crónico caracterizado por una búsqueda y consumo compulsivo de drogas, pérdida de control y manifestación de estados emocionales negativos como disforia, ansiedad e irritabilidad, reflejo del síndrome de abstinencia que emerge cuando la droga no está presente (Koob *et al*, 2004; Le Moal and Koob, 2007). El consumo ocasional de una sustancia de abuso es clínicamente diferente a su uso escalado, a la pérdida de control del consumo y a la búsqueda compulsiva de droga, situaciones que caracterizan al fenómeno de adicción (Koob *et al*, 2004). A pesar de que los primeros estudios sobre la neurobiología de la adicción se centraron en el impacto agudo de las drogas de abuso, la tendencia actual es estudiar los efectos de las drogas tras una administración crónica y los cambios neuroadaptativos inducidos en el cerebro responsables, en último término, de la recaída. El propósito de la investigación neurobiológica actual en el campo de las drogas de abuso es comprender los mecanismos genéticos, celulares y moleculares que median la transición desde un consumo ocasional y controlado a una pérdida de control, consumo escalado y recaída, incluso tras un periodo prolongado de abstinencia.

El hecho de que el consumo de sustancias tenga simultáneamente refuerzos positivos y negativos, implica que el proceso adictivo engloba aspectos tanto de trastornos relacionados con el control de los impulsos como con trastornos compulsivos (Tabla 1). Los trastornos del control de los impulsos se caracterizan por un incremento en la tensión, una activación que se anticipa a la realización del acto y un placer, gratificación o descanso en el momento en el que se lleva a cabo la acción. Estos trastornos están fuertemente relacionados con los mecanismos de refuerzo positivo (American Psychiatric Association, 1994). Por el contrario, los trastornos compulsivos se caracterizan por una sensación de ansiedad y estrés

antes de realizar un comportamiento repetitivo y una liberación de ese estrés a la hora de realizarlo. Dichos trastornos se encuentran ligados a automatismos y mecanismos de refuerzo negativo. El proceso adictivo, que engloba ambos tipos de trastornos (impulsivos y compulsivos) comprende tres estados: atracón/intoxicación, abstinencia/efectos negativos, obsesión/anticipación, donde la impulsividad domina en las etapas iniciales y la combinación impulsividad-compulsividad en los estadios más tardíos (Koob and Volkow, 2010).

Tabla 1.- Definiciones relacionadas con el proceso adictivo. Tabla modificada de (Koob, 2009).

Adicción	El Manual de Estadística y Diagnóstico de Desórdenes Mentales (DSM), publicado por la Sociedad Americana de Psiquiatría (1994), ha definido el término adicción como la dependencia a sustancias.
Impulsividad	Desde el punto de vista del comportamiento, impulsividad se define como una predisposición rápida y no planeada de reacciones ante estímulos tanto externos como internos, sin tener en cuenta las consecuencias negativas que estas reacciones puedan ocasionar (Moeller, 2001). La impulsividad se mide frecuentemente con dos variables; por la elección de una recompensa menor pero inmediata frente a una mayor pero demorada en el tiempo (Rachlin, 1972) o por la incapacidad de inhibir un comportamiento mediante cambios en el transcurso de la acción o de parar la respuesta una vez se ha iniciado (Logan, 1997). Es un déficit esencial en los desórdenes de abuso de sustancias (Allen, 1998).
Compulsividad	Definido como elementos del comportamiento que resultan en perseveración de respuestas a pesar de las consecuencias adversas, perseveración de respuestas incorrectas en situaciones de elección, o reiniciación persistente de actos habituales (Everitt, 2005). Los elementos que caracterizan la compulsividad están presentes en muchos de los síntomas descritos en el DSM IV: continuidad en el consumo de sustancias a pesar del conocimiento de haber tenido persistentes o recurrentes problemas físicos o psicológicos y una gran cantidad de tiempo invertido en actividades necesarias para obtener las sustancias de abuso (American Psychiatric Association. 2000).
Refuerzo positivo	Definido como el proceso por el cual la presentación de un estímulo, normalmente placentero (ej. droga), incrementa la probabilidad de generar una respuesta.
Refuerzo negativo	Definido como el proceso por el cual la retirada de un estímulo aversivo (ej. estado emocional negativo consecuencia de la abstinencia), incrementa la probabilidad de generar una respuesta (ej. consumo de droga).
Automatismo	Definido como comportamientos que son realizados sin ser consciente de ellos.
Motivación	Definido como "la tendencia de todo animal a realizar una actividad organizada" (Hebb, 1972).
Autoadministración intracraneal	Procedimiento por el cual las drogas son inyectadas directamente en el cerebro en mínimas cantidades y sirven como reforzantes positivos.
Preferencia de lugar condicionada	Procedimiento por el cual una droga es asociada con un determinado ambiente o contexto y una solución inocua con otro diferente. Posteriormente se testa la preferencia del animal por ambos contextos.

Conforme un individuo evoluciona desde un estado impulsivo a uno compulsivo, se produce un cambio en el control del comportamiento, que pasa a ser controlado por el refuerzo negativo (p.e. evitación de síntomas de retirada) más que por el refuerzo positivo asociado a la ingesta de drogas (Koob, 2004). Estos tres estados interaccionan unos con otros incrementando su intensidad, dando lugar en último término al estado patológico que caracteriza la adicción (Koob and Le Moal, 1997) (Tabla 2). La transición desde un consumo ocasional a la adicción se relaciona con cambios comportamentales y neuroplasticidad. Igualmente, parece ser que el consumo inicial de drogas afecta en mayor medida a individuos vulnerables o individuos que atraviesan por un periodo vulnerable del desarrollo como puede ser la adolescencia (Koob *et al*, 2008).

1.2- TRANSICIÓN DE UN CONSUMO OCASIONAL A LA ADICCIÓN: PATRONES DE CONSUMO EN MODELOS ANIMALES.

El consumo de drogas de abuso tiene en su fase inicial el objetivo claro de la obtención de una sensación de placer, bienestar y euforia. Con el consumo prolongado la acción, en un principio dirigida a meta, se transforma en una acción controlada por mecanismos estímulo-respuesta, llegando a convertirse en un hábito. Llegados a este punto, el control de la conducta, que en un principio estaba mediado por la corteza prefrontal (CP) y el estriado ventral, se va transfiriendo a regiones dorsales de los ganglios de la base a través de bucles que conectan corteza cerebral, estriado y neuronas dopaminérgicas del troncoencéfalo, adquiriendo con ello un carácter automático.

La región cerebral directamente implicada en la formación de hábitos o comportamientos automáticos, incluidos los relacionados con el consumo de drogas de abuso, es el estriado dorsal (Everitt and Wolf, 2002). En situaciones normales, esta transferencia libera a la CP del control de las conductas automáticas, con lo que ésta puede dedicarse al procesamiento de nueva información. A pesar de

que el objetivo último de la conducta es la obtención del placer, ésta se ha devaluado y el consumo de droga se mantiene al encontrarse bajo un control involuntario (Robbins and Everitt, 1999).

Tabla 2.- Modelos animales de laboratorio en diferentes etapas del proceso adictivo.

Tabla modificada de (Koob, 2009).

Etapa proceso adictivo	Modelos animales	Referencias
Intoxicación/ Atracón	Autoadministración	Collins 1984
	Preferencia de lugar condicionada	Sanchis-Segura 2006
	Estimulación cerebral	Kornetsky 1990
Abstinencia/	Respuestas de ansiedad	Sarnyai 1995, Schulteis 1998 Baldwin 1991
Emoción negativa	Aversión de lugar condicionada	Tzschentke 1998
	Umbral de refuerzo elevados	Markou 1998
	Incremento de la motivación para autoadministrarse en animales dependientes	O`Dell 2007, Tornatzky 2000 Ahmed 1998, Deroche-Gamonet 2004, Vanderschuren 2004
Obsesión/	Reestablecimiento inducido por drogas	Sanchis-Segura, 2006
Anticipación	Reestablecimiento inducido por claves	Sanchis-Segura, 2006
	Reestablecimiento inducido por estrés	Sanchis-Segura, 2006

Gran parte del progreso obtenido en el entendimiento de la neurobiología que subyace al proceso adictivo proviene de estudios realizados en modelos animales de adicción a diferentes sustancias como psicoestimulantes, opiodes, alcohol, nicotina y $\Delta 9$ -tetrahidrocannabinol (cannabis). A pesar de que los modelos animales no permiten emular el proceso adictivo producido en humanos, pueden ser modelos válidos para la investigación de fenómenos específicos (Tabla 2).

El incremento en la frecuencia e intensidad en el consumo de drogas es uno de los fenómenos que mejor caracterizan el desarrollo del proceso adictivo. El Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales (DSM) (American Psychiatric Association, 1994) define la dependencia de sustancias como un estado en el que la persona experimenta un efecto de tolerancia, de manera que la sustancia es tomada cada vez en mayor cantidad, no pudiendo disminuir el consumo a pesar de experimentar sus consecuencias negativas.

Dos modelos animales, uno en el que la droga es administrada por el experimentador y otro en el que es autoadministrada por el propio animal, han sido utilizados para estudiar los efectos que la administración repetida de sustancias ejerce sobre la neuroplasticidad de los circuitos cerebrales. En el modelo de sensibilización, que implica la administración repetida normalmente de un estimulante por parte del investigador y en un determinado contexto, la variable a analizar es la actividad locomotora. Los animales que reciben la droga muestran un incremento significativo de la actividad locomotora como respuesta a la administración de una dosis menor de la sustancia (*challenge*) que aquellos animales que reciben una sustancia inocua. Los modelos animales de autoadministración (*self-administration*, SA) donde el acceso a la droga puede ser prolongado, pueden ser paradigmas más válidos para estudiar la transición desde un consumo ocasional a adicción. La disponibilidad de droga durante mayor tiempo se ha asociado con una escalada en el consumo (Koob, 2009) y con cambios en el refuerzo y efecto incentivador de las drogas y de sus estímulos asociados. De esta manera se facilita la inducción de la dependencia a la sustancia, llegando a

consecuencias tales como un aumento en la realización de tareas relacionadas con la obtención de un refuerzo (Koob, 2009), un incremento en el reestablecimiento de la conducta tras la extinción (*reinstatement*) (Deroche-Gamonet *et al*, 2004) o una mayor resistencia al castigo, incluso si éste va aumentando, con el objetivo de obtener la droga (Vanderschuren and Everitt, 2004). Se sigue discutiendo si el aumento en el consumo asociado al acceso prolongado es debido a una sensibilización de la recompensa, a un estado en el que la recompensa se ha devaluado o a ambos (Vezina, 2004).

1.3- DROGAS ESTIMULANTES.

Los estimulantes (psicoestimulantes o psicotónicos) se han descrito como drogas capaces de aumentar los niveles de actividad cognitiva y la motricidad, de reforzar la atención y de reducir los umbrales de alerta o vigilia de manera que los individuos responden mas rápidamente ante cualquier clase de estímulo (Fernandez-Espejo, 2006). Los efectos que los psicoestimulantes producen en los individuos dependen de la interacción de muchos factores, entre ellos la dosis, vía de administración, medio en el cual se administran y la personalidad del individuo. En una persona normal, una dosis moderada de anfetamina, como puede ser entre 10-20 mg., produciría euforia, estado de alerta aumentado, anorexia, insomnio y un incremento en la realización de conductas repetitivas y estereotipias. A medida que la dosis fuera en aumento estos síntomas se agudizarían y la influencia del ambiente sería menos importante. Según el último informe elaborado por el Observatorio Europeo de Drogas y Toxicomanías sobre el consumo de drogas, unos 14.5 y 12.5 millones de europeos con edades comprendidas entre los 15 y 64 años son consumidores de cocaína y anfetamina respectivamente, lo que pone claramente de manifiesto el problema de la adicción a los psicoestimulantes (EMCDDA, 2011).

1.3.1. Cocaína

La cocaína o metil éster de benzoilecgonina pertenece a la familia de los alcaloides naturales. Suele consumirse en forma de clorhidrato de cocaína que puede ser administrada por vía intravenosa, vía nasal o en forma de pasta base que puede ser fumada. En función del modo de administración, sus efectos comienzan a percibirse al cabo de los 8-10 minutos si es fumada o por vía intravenosa y más rápidamente, unos 3-5 minutos, si es vía intranasal. Su vida media es de 1 hora aunque la duración de sus efectos es mucho menor.

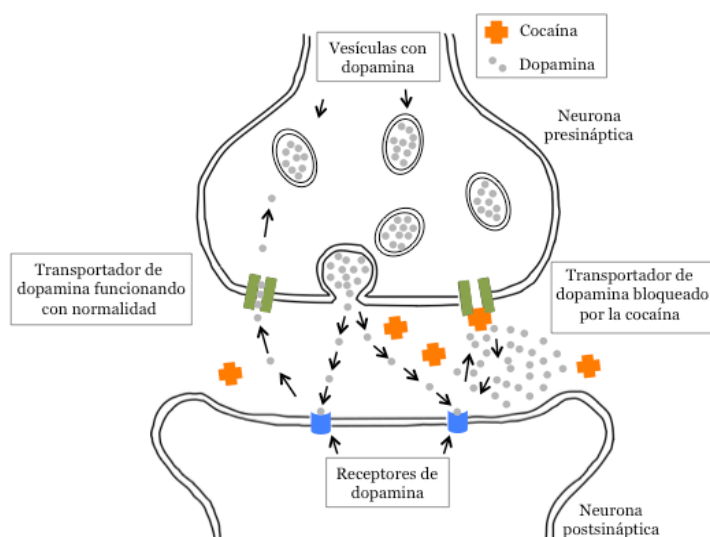


Figura 1.- Mecanismo de acción de la cocaína. La cocaína bloquea los transportadores de DA, NA y 5-HT, facilitando la acumulación de los neurotransmisores en el espacio sináptico y provocando la estimulación persistente del sistema nervioso central. En condiciones normales, la DA liberada en la hendidura sináptica es recaptada por el DAT y devuelta al interior de la célula donde vuelve a almacenarse en vesículas. Figura modificada de (Iversen, 2000).

Se cree que sus efectos reforzantes son debidos principalmente a la capacidad de unirse a los transportadores de dopamina (DA), noradrenalina (NA) y

serotonina (5-HT), de manera que al inhibir la captura de estos neurotransmisores éstos se acumulan en la hendidura sináptica (Ritz *et al*, 1987). Incrementa la actividad dopaminérgica fundamentalmente en las regiones del área tegmental ventral (ATV) y núcleo accumbens (NAc), principales áreas del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico y la actividad glutamatérgica en el ATV, NAc, CP y núcleo estriado (Kalivas and Duffy, 1998) (Figura 1).

1.3.2. Anfetamina

La anfetamina es una fenilisopropilamina sintetizada químicamente a partir de la efedrina, siendo la d-anfetamina su isómero más potente a nivel central. Se puede administrar por vía oral, intravenosa, intranasal o fumada. Por vía oral sus efectos aparecen a los 30-60 minutos después de la administración y pueden tener una duración de entre 8-24 horas. Su vida media es de unas 10 horas. Las anfetaminas son agonistas directos de los transportadores de NA y DA. Su efecto estimulante se debe a la capacidad que posee para penetrar en el citosol, bien a través del DAT o difundiendo a través de la membrana, e inducir la liberación de neurotransmisores desde las vesículas donde se encuentran almacenados (Schmitz *et al*, 2001; Sulzer *et al*, 2005). La acumulación de DA en el citosol promueve que el transportador actúe de modo inverso, desde el interior de la neurona presináptica hasta la hendidura sináptica, aumentando la concentración de DA en el espacio extracelular (Robertson *et al*, 2009) (Figura 2). Este incremento extracelular en los niveles de DA en regiones estriatales está relacionado con el incremento de la sensación de euforia (Volkow *et al*, 2007).

1.3.3. Efectos farmacológicos

Cuando se administran vía intravenosa o son fumadas, ambas drogas producen una sensación rápida de placer conocida como *rush*, acompañada de un estado incrementado de alerta, aumento de la energía y de un estado subjetivo de mejora de las capacidades y habilidades. A medida que los efectos van menguando, la sensación de euforia va decayendo, siendo la disminución más pronunciada cuanto más rápidos o intensos fueron los efectos iniciales. Este estado

de disforia incrementa el deseo de volver a consumir de nuevo. Cuando estas sustancias son administradas vía nasal, no se experimenta la sensación inicial de *rush* y la sensación de euforia tarda más en hacerse patente. La metanfetamina ingerida por vía oral presenta estos mismos efectos. Nerviosismo, agitación, temblores, fiebre, insomnio, confusión, y en algunos casos delirios y paranoias, pueden ser otros de los síntomas que se experimenten tras el consumo. El patrón de consumo tiene una tendencia cíclica en la que se combinan periodos de máximo consumo, en el que los individuos que son dependientes a estas sustancias apenas duermen o comen, con periodos libres de ingesta (Volkow, 2006).

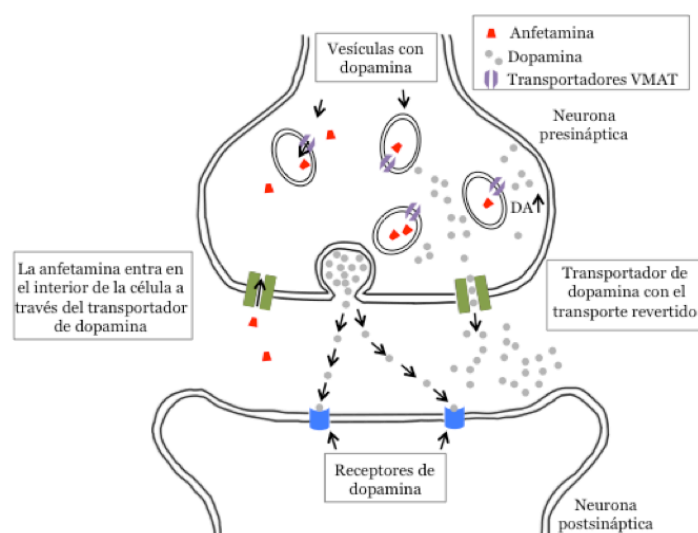


Figura 2.- Mecanismo de acción de la anfetamina. Una vez la anfetamina ha penetrado en el citosol de las neuronas presinápticas, tanto a través del transportador de DA como por difusión a través de la membrana plasmática, interactúa con los transportadores VMAT, localizados en la membrana de las vesículas que almacenan monoaminas, produciendo la liberación de DA. La acumulación de DA en el citosol, incrementada también por los efectos inhibitorios de la anfetamina sobre la enzima monoamino oxidasa, promueve el transporte inverso de DA a través del DAT. Estos efectos incrementan rápidamente la concentración de neurotransmisores en el espacio sináptico facilitando o inhibiendo, en función del receptor postsináptico activado, la transmisión del impulso nervioso en las redes neuronales.

1.3.4. Tolerancia

La tolerancia se define como la disminución progresiva de los efectos de una droga de manera que se necesitan cada vez dosis mayores para conseguir los mismos efectos subjetivos. Este proceso está mediado por varios factores; una regulación a la baja y reducida sensibilidad de los receptores de la neurona postsináptica así como cambios en los autoreceptores de la neurona presináptica que afectan a los niveles de DA. Además, a menudo se producen en los sistemas de neurotransmisión cambios compensatorios opuestos que ayudan a mantener el equilibrio homeostático (Koob and Le Moal, 2001). Como consecuencia de estos procesos de tolerancia, cuando se interrumpe abruptamente el consumo de la sustancia adictiva se produce como resultado un desequilibrio de la homeostasis, de manera que los procesos compensatorios dominan, dando lugar a los síntomas del síndrome de abstinencia.

Los sistemas neurotransmisores que se encuentran afectados varían de una sustancia a otra. Por ejemplo, la tolerancia al alcohol implica cambios en dos dianas; receptores inhibidores GABA y receptores excitatorios de glutamato (NMDA) (Krystal *et al*, 2003; Krystal *et al*, 2006). Administrado de forma aguda, el alcohol reduce la actividad cerebral incrementando la actividad de los receptores GABAérgicos y antagonizando la de los receptores NMDA. Una exposición crónica a alcohol produce cambios en las subunidades de los receptores GABA haciéndolos menos sensibles, más tolerantes, lo que se traduce en un mayor consumo (Krystal *et al*, 2006). Por otra parte, la nicotina afecta a los receptores de acetilcolina nicotínicos (nAChRs). Como otras sustancias de abuso, la nicotina incrementa la concentración de DA en el NAc mediante la estimulación de los receptores nAChRs del ATV, que a su vez estimulan la liberación de glutamato.

1.3.5. Sensibilización

La sensibilización a los efectos psicomotores es uno de los efectos que las drogas de abuso tienen en común y una de las características más rápidamente observables tras un tratamiento repetido (Vanderschuren and Pierce, 2010). La presencia de este fenómeno se ha asociado con la hiperfunción dopaminérgica mesocorticolímbica (Pierce and Kalivas, 1997; Robinson and Berridge, 1993; Vanderschuren and Kalivas, 2000). El desarrollo de la sensibilización puede dividirse en dos etapas: iniciación y expresión. La fase inicial, ligada al ATV, es en la que tienen lugar los procesos neuronales que inducen la sensibilización mientras que la expresión, relacionada con el NAc, hace referencia a las consecuencias de la sensibilización a largo plazo (Steketee and Kalivas, 2011).

Los datos disponibles sugieren que la sensibilización está relacionada con muchos de los procesos implicados en la adicción, pero no con todas las fases ni aspectos. En roedores, primates (Bradberry, 2007) y humanos, la sensibilización locomotora y dopaminérgica ha sido consistentemente observada tras una exposición limitada a la droga y se ha asociado con un aumento en sus propiedades reforzantes y recompensantes. Sin embargo, tras un consumo excesivo, no se observa ni sensibilización de los efectos psicomotores ni sensibilización a la respuesta dopaminérgica en el NAc, incluso si la motivación por la droga persiste, lo que sugiere que la sensibilización psicomotora no ejerce un papel necesario para la expresión del comportamiento adictivo. Estos hechos, junto con evidencias que indican que animales sensibilizados muestran una mayor motivación por refuerzos naturales, sugiere que la sensibilización representa un incremento generalizado en la sensibilidad de los sistemas neuronales que regulan la motivación. Debido a esto se ha postulado que la sensibilización constituye un fenómeno importante en el proceso adictivo, ya que a través de él se incrementa el grado de atracción a las drogas, aumentando la probabilidad de que vuelvan a ser consumidas de nuevo (Vanderschuren *et al*, 2010).

El ambiente puede ejercer un gran efecto durante esta fase de consumo, influyendo tanto en la fase inicial de la sensibilización como en su

expresión. Animales repetidamente expuestos a drogas como cocaína, anfetamina o morfina durante la fase inicial en un contexto determinado, presentan una mayor expresión de la sensibilización cuando son reexpuestos a ese mismo contexto (sensibilización dependiente del contexto) que animales que son testados en un ambiente diferente al que recibieron la droga y que por tanto no han establecido una asociación (Anagnostaras and Robinson, 1996; Mattson *et al*, 2008; Vezina *et al*, 1989; Vezina and Leyton, 2009; Wang and Hsiao, 2003).

El incremento en la actividad locomotora como respuesta a un *challenge* ha sido considerado el método estándar para determinar si la sensibilización ha tenido lugar. Sin embargo, actualmente se piensa que la SA es una manera mucho más relevante de estudiar el comportamiento adictivo en modelos animales. A pesar de que los sustratos neuronales responsables de la hiperactividad inducida por las drogas y sus propiedades subjetivas solapan en gran medida (Koob, 1992; Pierce and Kumaresan, 2006; Wise and Bozarth, 1987), la actividad locomotora es, en el mejor de los casos, una medida indirecta del impacto de las drogas sobre el sistema del refuerzo y procesos motivacionales. Tras una administración continuada de psicoestimulantes, la actividad locomotora típicamente va en aumento. Sin embargo, dependiendo del tipo de droga estimulante administrada pueden aparecer comportamientos estereotipados que compiten directamente con la respuesta locomotora, como se ha observado en el caso de drogas del tipo anfetamínico (Leith and Kuczenski, 1982). La preferencia de lugar condicionada (CPP) es otro método empleado para medir la sensibilización. En este paradigma, la sensibilización se pone de manifiesto como un aumento en el tiempo que el animal pasa en el compartimento que ha sido asociado a la droga (Lett, 1989; Shippenberg *et al*, 1996). Paralelamente a la sensibilización locomotora, que tanto la cocaína como la anfetamina producen, se ha demostrado que la exposición previa a estas sustancias facilita la conducta de SA (Covington and Miczek, 2001; Horger *et al*, 1992; Horger *et al*, 1990; Piazza *et al*, 1989; Piazza *et al*, 1990; Pierre and Vezina, 1997, 1998; Valadez and Schenk, 1994). La administración de anfetamina por parte del experimentador produce un consumo

de cocaína en escalada cuando los animales tienen un acceso diario prolongado (Ferrario and Robinson, 2007). Este efecto puede culminar en la pérdida de control que caracteriza a la adicción. Durante esta fase tardía del proceso adictivo, la sensibilización se ve enmascarada por cambios neuronales y comportamentales, como puede ser una reducida sensibilidad de las vías de refuerzo (Koob *et al*, 2004). Sin embargo, esto no indica que los cambios neuronales que subyacen al proceso de sensibilización se hayan revertido. De hecho, estudios en animales demuestran que la sensibilización es un proceso que puede ser extremadamente duradero (Paulson *et al*, 1991) y persistir tras un largo tiempo de abstinencia (Pierce *et al*, 1997; Vanderschuren *et al*, 2000), de manera que puede resurgir y jugar un papel importante en determinados aspectos, como puede ser un alto riesgo de recaída que puede mantenerse de por vida.

1.4- VÍAS NEUROBIOLÓGICAS DE LA ADICCIÓN Y PAPEL DE LA DOPAMINA.

El conocimiento de los sustratos neurobiológicos que explican los efectos reforzantes de las drogas de abuso se inició con el desarrollo de técnicas como la estimulación eléctrica cerebral o la autoestimulación cerebral (Olds and Milner, 1954), que permitieron la identificación del sistema de la recompensa. Las vías neuronales implicadas en la adicción son las mismas que subyacen al proceso de la motivación, al procesamiento del refuerzo y a la toma de decisiones. En términos de equilibrio, lo que comienza como un estado homeostático se altera hasta un punto en el que el equilibrio solo puede ser mantenido gracias a una continuidad en el consumo de la droga (Koob *et al*, 2001).

A pesar de que el sistema de la recompensa está controlado por un amplio circuito, la vía más importante en este proceso es el haz prosencefálico medial, que conecta el ATV con el NAc, caracterizado por presentar unos umbrales de sensibilidad bajos (Olds *et al*, 1954). Todas las drogas de abuso, cuando son administradas de forma aguda, disminuyen estos umbrales de sensibilidad, de

manera que se percibe una mayor sensación de recompensa (Kornetsky and Esposito, 1979). Por el contrario, cuando la administración es crónica, estos umbrales se incrementan experimentando una sensación de recompensa menor. A pesar de que inicialmente se enfatizó el papel de los sistemas monoaminérgicos como responsables de la recompensa, primero con la NA (Stein, 1961) y después con la DA (Crow, 1973; Wise, 1978), actualmente se sabe de la implicación de otros sistemas de recompensa no dopaminérgicos (Hernandez *et al*, 2006).

El sistema dopaminérgico, aún hoy considerado clave en el circuito del refuerzo y comportamientos motivados, implica a las siguientes estructural cerebrales (Lingford-Hughes *et al*, 2010):

- Núcleo Accumbens (NAc); implicado en el aprendizaje de los refuerzos asociados a determinados comportamientos o situaciones y en la expresión de comportamientos adaptativos.
- Corteza orbitofrontal (COF); implicada en la evaluación de los estímulos y control de los impulsos. Nos indica “qué es lo que queremos”, permitiéndonos esperar para obtener una recompensa mayor u obtener una menor pero de manera inmediata.
- Amígdala; responde a la intensidad de la recompensa o estímulo aversivo, además de relacionar eventos motivacionalmente relevantes con estímulos neutros y los sistemas endocrino y autonómico.

Consistente con la gran cantidad de trabajos preclínicos existentes, el incremento de DA en el estriado ventral se ha relacionado con los efectos placenteros y eufóricos experimentados tras el consumo de psicoestimulantes (Volkow *et al*, 2003). Estos aumentos en la concentración de DA también han sido observados, aunque no de forma consistente, tras el consumo de nicotina y alcohol, pero sin embargo no se han asociado con la sensación de *high* (Boileau *et al*, 2003; Montgomery *et al*, 2007). Por el contrario, los opiodes no producen este efecto y en algún caso se ha descrito incluso una reducción en los niveles del neurotransmisor (Daglish *et al*, 2008). En este caso concreto, puede que los niveles de DA fueran

realmente bajos para ser detectados, aunque el efecto reforzante puede deberse de todas maneras a la activación de vías no dopaminérgicas.

Durante el consumo crónico de drogas se produce un efecto bifásico en la liberación de DA. Tras el consumo, la cantidad de DA extracelular se eleva produciéndose una disminución en la liberación del neurotransmisor cuando éste cesa. Este fenómeno de hipodopaminergia endógena se ha observado durante la abstinencia de diferentes drogas de abuso como cocaína (Ackerman and White, 1992; Imperato *et al*, 1992; Parsons *et al*, 1991; Robertson *et al*, 1991; Sutton and Beninger, 1999; Weiss *et al*, 1992; Wu *et al*, 1997), morfina (Acquas and Di Chiara, 1992; Pothos *et al*, 1991), alcohol (Diana *et al*, 1993; Rossetti *et al*, 1992; Rossetti *et al*, 1991) y nicotina (Hildebrand *et al*, 1998) y se ha asociado a cambios neuroadaptativos que afectan, principalmente, a los circuitos relacionados con la recompensa. Recientemente se ha planteado la posibilidad de que el estado disfórico que se experimenta durante las primeras etapas del síndrome de abstinencia, podría deberse a una hipoactividad en los circuitos de la recompensa como consecuencia de un aumento en la actividad del AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y del factor de transcripción CREB (*cAMP response element binding protein*) en el NAc (Nestler, 2001). La activación del AMPc y la consecuente inducción de CREB, son los responsables del incremento en la expresión de dinorfina, un péptido opioide, en algunas neuronas espinosas intermedias de proyección del NAc, que disminuiría la liberación de DA acentuando el estado disfórico (Nestler, 2001, 2004). Esta disminución en la actividad dopaminérgica tras el consumo crónico de sustancias de abuso, podría corresponderse con los fenómenos de hipersensibilidad dopaminérgica que se observa en modelos animales de adicción (Robinson *et al*, 1993) y podría constituir una de las bases neurobiológicas que explicaría la recaída en el consumo.

1.4.1. Receptores D1

Los receptores de D1 de DA juegan un papel importante en el desarrollo de la adicción y han sido relacionados con la sensibilización inducida por el consumo crónico de drogas, especialmente psicoestimulantes. Estos receptores modulan la liberación de glutamato. Hay que destacar el hecho de que no se encuentran en las neuronas dopaminérgicas del ATV, sino en las terminales de glutamato procedentes de la CP y tegmento laterodorsal. Esto hace pensar que la DA al actuar sobre los receptores D1 produce un aumento en la liberación de glutamato en el ATV. Ensayos experimentales han apoyado esta teoría gracias a estudios en los que el fenómeno de sensibilización inducido por cocaína o anfetamina es bloqueado por antagonistas D1 (Bjijou *et al*, 1996; Hall *et al*, 2009; Vezina, 1996).

Se han descrito dos tipos de cambios neuroadaptativos que afectan a los receptores D1 y que ejercen un papel importante en la sensibilización dopaminérgica inducida por el consumo crónico de drogas. Por una parte, estudios en roedores han demostrado una regulación al alza en regiones del NAc y estriado dorsal, evidente durante los primeros días de abstinencia después de la administración de cocaína (Alburges *et al*, 1993; Unterwald *et al*, 1994; Unterwald *et al*, 2001), alcohol (Djouma and Lawrence, 2002; Lograno *et al*, 1993) y opiáceos (May *et al*, 1998). Por otra parte, la sensibilización inducida por el consumo crónico de la droga, se ha asociado con un aumento en la respuesta de los receptores D1 que persiste incluso un mes después del inicio de la abstinencia (Henry *et al*, 1998; Henry and White, 1995).

1.4.2. Receptores D2

La densidad de receptores D2 de DA es uno de los parámetros más estudiados en relación a la adicción, aunque a pesar de ello, los datos obtenidos de estudios con modelos animales aportan resultados contradictorios. Los experimentos con roedores describen una regulación al alza de los receptores D2, tanto en el NAc como en el estriado dorsal, tras la interrupción de la administración

repetida de cocaína (Peris *et al*, 1990; Unterwald *et al*, 1994; Wallace *et al*, 1996), alcohol (Djouma *et al*, 2002; Rommelspacher *et al*, 1992; Souza-Formigoni *et al*, 1999) y opiáceos (Izenwasser *et al*, 1998). Sin embargo otros estudios realizados tanto en ratas como en monos, han aportado datos en los que no se observan cambios en la densidad de los receptores e incluso resultados que indican una disminución en la región del estriado (Chen *et al*, 1999; Farfel *et al*, 1992; Neisewander *et al*, 1994; Vasconcelos *et al*, 2003). Los resultados obtenidos en humanos han demostrado una regulación a la baja de receptores D2 en el estriado de pacientes adictos, comparándolo con pacientes sanos (Heinz *et al*, 2004; Martinez *et al*, 2004; Volkow *et al*, 2001; Wang *et al*, 1997). Esta baja disponibilidad de receptores D2 observada en adictos, ha sido relacionada con el efecto hedónico de los psicoestimulantes. Estudios preclínicos en primates han corroborado esta asociación, demostrando que rehabilitando a los animales en grupos de 4 individuos se produce un incremento en los niveles de receptor D2 en aquellos monos que llegan a ser dominantes, mientras que los niveles permanecen bajos en los que son subordinados (Morgan *et al*, 2002). Cuando los animales tienen acceso a cocaína, los subordinados consumen más que los dominantes, hecho consistente con la hipótesis de que niveles bajos de D2 están asociados con un nivel hedónico mayor derivado del consumo de drogas. Estudios posteriores con los mismos primates han mostrado que un aumento en la interacción social puede reducir los efectos reforzantes de la cocaína (Nader *et al*, 2006), lo que puede indicar que el ambiente puede alterar la función dopaminérgica estriatal. Rasgos psicogenéticos, como un nivel de impulsividad elevado, pueden también incrementar la vulnerabilidad a las adicciones. Se ha demostrado que ratas impulsivas tienen niveles bajos de receptor D2 en el estriado y consumen cantidades de cocaína mucho mayores que ratas menos impulsivas (Dalley *et al*, 2007) (Figura 3).

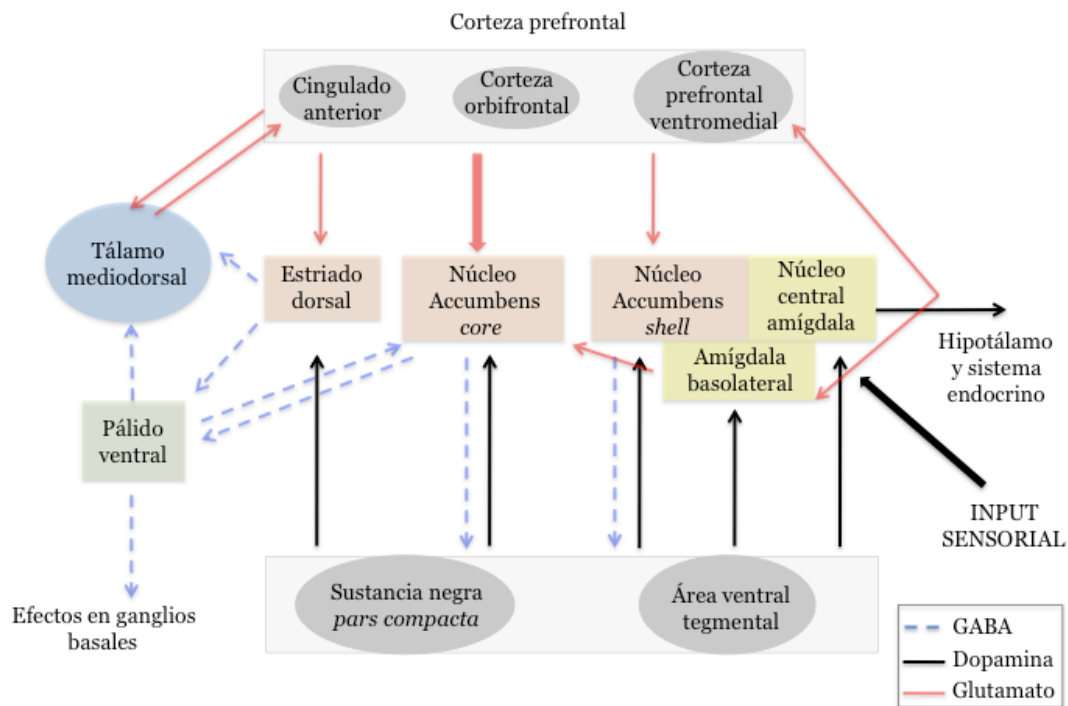


Figura 3.- Estructuras clave y conexiones implicadas en el proceso adictivo. Figura modificada de (Lingford-Hughes *et al*, 2010).

Modelos preclínicos han demostrado que la sensibilización, manifestada como un incremento en la concentración de DA y cambios en el comportamiento, se hace patente con menos cantidad de droga tras una exposición repetida. Voluntarios sanos muestran, 14 días e incluso un año después de una única administración de anfetamina, grandes incrementos en la liberación de DA y alteraciones en el comportamiento como respuesta a un *challenge* (Boileau *et al*, 2007). Sin embargo en adictos la reducción en la función dopaminérgica, medida como una reducción en la síntesis y liberación de DA y en los niveles de receptor D2, sugiere que la sensibilización no es un factor predominante de la dependencia a sustancias de abuso en humanos (Narendran and Martinez, 2008; Volkow *et al*, 2009).

La abstinencia no siempre conduce a una “normalización” de la función. Niveles bajos de receptores D2 están asociados con una mayor vulnerabilidad a las drogas y mayores efectos hedónicos tras el consumo, pero ¿son estos niveles reducidos de D2 la causa o la consecuencia del consumo abusivo de sustancias? La pregunta no tiene una fácil respuesta ya que en humanos es problemático establecer una relación entre la cantidad de droga consumida y la función dopaminérgica. Sin embargo, estudios preclínicos en primates han mostrado que el abuso de cocaína puede reducir los niveles de receptor D2 (Nader *et al*, 2008), que pueden incrementar de manera variable durante la abstinencia. Personas dependientes en fase de recuperación, experimentan síntomas depresivos o disforia que pueden estar relacionados con una baja actividad del sistema dopaminérgico, y que incrementan el riesgo de recaídas. Cómo optimizar la recuperación o normalización del sistema, sería un punto importante a tener en cuenta para el diseño de tratamientos, debido a la importancia que este sistema ejerce en la mediación del placer que se experimenta diariamente.

La DA juega un papel importante en la dependencia de sustancias, sin embargo se ha comprobado que su liberación no se produce como respuesta a una recompensa si no ante la presencia de estímulos asociados (Schultz, 2001). En dependientes de cocaína y heroína, la presencia ante determinados estímulos produjo un incremento en el nivel de DA mientras que el consumo de la droga no indujo el mismo efecto (Daglish *et al*, 2008; Volkow *et al*, 2006; Zijlstra *et al*, 2008). Esta liberación es más predominante en el estriado dorsal, lo que podría reflejar la transición “de hábitos” desde la parte límbica al estriado dorsal, tal y como ha sido propuesto por Everitt y Robbins (Everitt and Robbins, 2005).

Recientemente se ha relacionado a los receptores D3, un subtipo de la familia de receptores D2, con la sensibilización dopaminérgica que resulta de una administración repetida de psicoestimulantes. Estos receptores se encuentran principalmente en el *shell* del NAc y, en menor cantidad, también en el *core* y en áreas del estriado dorsal. Estudios en roedores han demostrado que lesionando unilateralmente la vía nigro-estriatal, que transmite DA desde la sustancia *nigra*

hasta el estriado, se produce una regulación al alza de receptores D3 tras la administración repetida de antagonistas dopaminérgicos, precisamente en las regiones del estriado dorsal y NAc *core* donde estaba prácticamente ausente (Bordet *et al*, 1997). Actualmente se sabe que la expresión de estos receptores depende del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y se ha planteado que puede ser responsable de la sensibilidad dopaminérgica y de los síntomas de tipo psicótico experimentados por algunos individuos tras el consumo de psicoestimulantes (Guillin *et al*, 2001; Sokoloff *et al*, 2002).

Acompañando a estos cambios estriatales también se producen neuroadaptaciones en las áreas de proyección del sistema dopaminérgico mesocorticolímbico a la CP (Figura 4). Esta región cerebral está implicada en los aspectos motivacionales de las conductas dirigidas a meta (Goldstein *et al*, 2002b; Tremblay and Schultz, 1999) y alteraciones en su función pueden en parte explicar la conducta compulsiva de búsqueda (Volkow and Fowler, 2000). Aunque en la CP la densidad de receptores D1 y D2 es mucho menor que en el estriado, los cambios neuroadaptativos que se producen tras el consumo crónico desempeñan un papel importante en el transcurso del proceso adictivo. Uno de los cambios adaptativos descritos recientemente implica a las células piramidales de la CP. Durante el consumo crónico, la proteína G del sistema de señalización intracelular del receptor D1 se ve afectada, induciendo un desequilibrio entre ambas familias de receptores D1 y D2. Esto produce a su vez un desequilibrio entre los propios receptores, en el que la actividad del receptor D1 se ve favorecida respecto a la del D2 (Bowers *et al*, 2004). Este desequilibrio desencadena un estado inhibitorio en el que solo los estímulos más potentes pueden provocar la activación y motivar la conducta. En el caso de individuos dependientes, solo las drogas y estímulos previamente asociados a ellas, y no reforzantes naturales como la comida o el sexo, son lo suficientemente fuertes como para permitir la liberación de la DA necesaria para activar la CP, superando la inhibición consecuencia de la activación de los receptores D1 (Kalivas *et al*, 2005a; Lewis and O'Donnell, 2000).

Estudios experimentales han mostrado que durante las fases iniciales del proceso adictivo, la cocaína solo afecta a determinadas áreas de la CP, pero a medida que el proceso sigue su curso, otras regiones se van viendo implicadas afectando finalmente al correcto funcionamiento de la estructura. Se produce una reducción en la actividad de la COF y CP ventromedial, lo que se cree es un reflejo de la transición desde un control prefrontal con toma de decisiones voluntarias a un control estriatal compulsivo (Everitt *et al*, 2005). Esta transición, característica del proceso adictivo, donde las drogas pasan de tener un efecto hedónico y placentero a ser una necesidad y depender de ellas, está sustentado por cambios en la plasticidad sináptica y función neurotransmisora (Everitt *et al*, 2008).

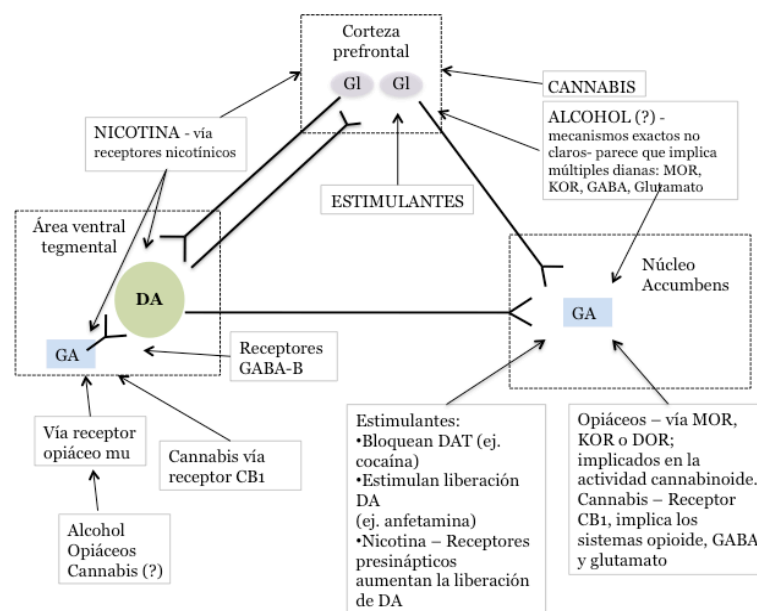


Figura 4.- Áreas cerebrales de interacción entre las sustancias de abuso y el sistema mesolímbico dopaminérgico y sus moduladores clave. Figura modificada de (Lingford-Hughes *et al*, 2010).

1.5- OTROS SISTEMAS NEUROTRANSMISORES MODULADORES DEL SISTEMA MESOLÍMBICO IMPLICADOS EN EL REFUERZO Y LA MOTIVACIÓN.

1.5.1. Ácido Gamma aminobutírico

El ácido gamma aminobutírico (GABA) es un inhibidor clave de la activación del sistema dopaminérgico a través de los receptores GABA_B localizados en neuronas dopaminérgicas. Una incrementada inhibición de la activación puede conseguirse mediante anticonvulsionantes, como vigabatrina, que incrementan la concentración de GABA o mediante agonistas de los receptores GABA-B tales como el baclofén. En modelos preclínicos, la administración de baclofén reduce la búsqueda y consumo de una gran número de sustancias adictivas como alcohol, cocaína y nicotina (Cousins *et al*, 2002), además de reducir la liberación de DA tanto en el estriado dorsal como ventral (Filip and Frankowska, 2008).

1.5.2. Opioides

Existen tres receptores opioides principales: receptor mu (MOR), receptor kappa (KOR) y receptor delta (DOR). La activación de MOR y DOR está asociada con la recompensa, mientras que la activación de KOR en el NAc la atenúa (Le Merrer *et al*, 2009). Dado que los receptores MOR son inhibitorios, su activación mediante endorfinas resulta en una inhibición de las neuronas GABA. Por lo tanto, el freno GABAérgico en las neuronas dopaminérgicas es anulado dando como consecuencia un incremento en la descarga y liberación de DA en el NAc. Estudios preclínicos han mostrado que en ratones que carecen de receptores MOR el consumo o administración de opioides no es recompensante y, además, no presentan síndrome de abstinencia (Le Merrer *et al*, 2009). Estudios de neuroimagen revelaron un incremento de receptores MOR en individuos abstinentes de opioides, alcohol o cocaína, por lo que se ha postulado que la alteración en estos receptores puede tener un papel importante en la adicción (Gorelick *et al*, 2005; Williams *et al*, 2007; Williams *et al*, 2009). Además, un incremento en estos receptores MOR en individuos dependientes de cocaína o alcohol, se ha asociado con un aumento en las ansias por consumir (*craving*). Este

incremento en la densidad de receptores persiste tras un largo periodo de abstinencia en algunas regiones cerebrales (Gorelick *et al*, 2005; Williams *et al*, 2007). Recientemente se ha atribuido a los receptores opioides un papel en la impulsividad, gracias a estudios en los que se ha descubierto que ratones carentes de receptores MOR son menos impulsivos (Olmstead *et al*, 2009). La naltrexona, un antagonista opioide, puede incrementar la actividad en una región clave de la COF implicada en la capacidad de esperar para obtener una recompensa mayor en lugar de obtener una más pequeña sin demora (Boettiger *et al*, 2009).

1.5.3. Glutamato

Es el principal neurotransmisor cerebral excitatorio y sus receptores, N-metil D-aspartato (NMDA) se han relacionado con diferentes aspectos de la adicción a diferentes sustancias. Las proyecciones glutamatérgicas desde la CP, amígdala e hipocampo, incrementan la liberación de DA directamente en el NAc o vía ATV. Cada vez hay más evidencias a favor de la idea de que el glutamato juega un papel importante en la sensibilización. Se ha comprobado que en ratas sensibilizadas los niveles de neurotransmisor son mayores en respuesta a la cocaína en comparación con ratas normales. Además, la administración de antagonistas de los receptores NMDA bloquean la sensibilización a cocaína y morfina (Lingford-Hughes *et al*, 2010). Kalivas y Volkow (Kalivas and Volkow, 2005b) sugieren que los comportamientos de “*craving*” y búsqueda de droga, están mediados por una vía común de proyecciones desde la CP al NAc y pálido ventral. Cambios en la conexiones sinápticas de esta vía dependen de estas fibras glutamatérgicas que parten desde la CP y que convergen en las espinas dendríticas del NAc con aferentes dopaminérgicas del ATV. Dichas alteraciones en la conectividad sináptica pueden dar lugar a un rápido reestablecimiento de la conducta de consumo durante la abstinencia. Este reestablecimiento puede provocarse mediante estrés, mediante la presencia de estímulos previamente asociados a la droga o mediante un *challenge*. El consumo repetido de sustancias puede conducir a una reorganización sináptica de estas conexiones que a su vez producirían cambios en la actividad neuronal y por lo tanto en el comportamiento.

Los cambios moleculares que subyacen de la alteración en la conectividad sináptica, pueden ocurrir tanto en neuronas presinápticas como postsinápticas del NAc y CP, como se ha visto reflejado por cambios en la actividad con estudios de neuroimagen.

2. FARMACOTERAPIA DE LA ADICCIÓN A PSICOESTIMULANTES

La dependencia a psicoestimulantes se ha descrito como un desorden crónico caracterizado por una búsqueda y consumo compulsivo a pesar de las consecuencias negativas (Dackis and O'Brien, 2001; Goldstein and Volkow, 2002a). La cocaína se ha convertido en una droga de consumo común en Europa. El Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías estiman que aproximadamente 4 millones de europeos (1.2%) han consumido esta sustancia durante el último año. En países como Irlanda, España, Chipre y Reino Unido, el consumo de cocaína durante el pasado año se situó por encima de la media europea. Los datos en cuanto al consumo de anfetamina indican que unos 2 millones de personas consumieron la droga durante el último año.

En el diseño de medicaciones para el tratar el problema de la adicción hay dos objetivos a tener en cuenta: primero que el tratamiento ayude a los individuos en la primera fase de la abstinencia mitigando los síntomas y segundo que las medicaciones ayuden a evitar la recaída (Kampman, 2009). Actualmente no existe una terapia farmacológica específica con eficacia establecida para el tratamiento de la dependencia a psicoestimulantes. Recientes avances en la neurobiología han identificado varios mecanismos neuronales implicados en el proceso adictivo (Goldstein *et al*, 2002a; Koob, 2000) que han conducido al desarrollo de medicaciones con resultados prometedores tanto en ensayos preclínicos como clínicos.

2.1- MEDICACIONES EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA DEPENDENCIA A LA COCAÍNA.

Actualmente no existen medicaciones aprobadas por la Agencia de Drogas y Medicamentos (FDA) para el tratamiento de la adicción a

psicoestimulantes. En este apartado se va a hacer una revisión centrada en las medicaciones que han sido evaluadas clínicamente (Dackis, 2004; Vocci and Elkashef, 2005b) y que han mostrado eficacia en ensayos clínicos publicados, especialmente con aquellos agentes que afectan a los sistemas neurotransmisores mencionados en apartados anteriores. Los agentes glutamatérgicos muestran resultados muy prometedores en estudios con modelos animales (Kalivas, 2004) sin embargo, hasta la fecha, no ha sido publicado ningún ensayo clínico que muestre eficacia con una medicación puramente glutamatérgica (Berger *et al*, 2005; Ciraulo *et al*, 2005). Los estudios preliminares en humanos con la vacuna anti-cocaína, N-acetilcisteína y compuestos prometedores en estudios preclínicos también están recogidos. La tabla 3 incluye algunos de los compuestos que han sido empleados en pruebas clínicas controladas, clasificados en base a su mecanismo de acción.

2.1.1. Agentes GABA

- Topiramato

El topiramato es un anticonvulsionante empleado también en la prevención de migrañas. Ejerce varias acciones neurofarmacológicas; incrementa los niveles cerebrales de GABA, facilita la neurotransmisión GABAérgica e inhibe la actividad glutamatérgica de los receptores de glutamato del subtipo AMPA y kainato.

En estudios animales se ha observado que el topiramato reduce la autoadministración de cocaína así como la respuesta dopaminérgica tras la administración de la droga y exposición a estímulos relacionadas con ella (Johnson, 2005).

Un ensayo clínico ha mostrado que la administración de topiramato a lo largo de 6 semanas en pacientes dependientes de cocaína y alcohol, redujo el consumo de ambas sustancias durante el tiempo en el que el estudio tuvo lugar (Johnson, 2005). Otro estudio similar mostró que los individuos dependientes de

cocaína que recibieron el tratamiento durante 13 semanas redujeron significativamente el consumo de cocaína comparado con pacientes que recibieron placebo. El 59% de las personas tratadas se mantuvieron abstinentes durante 3 semanas (Kampman *et al*, 2004).

- Baclofén

El baclofén es un relajante muscular agonista del receptor GABA_B. Se utiliza en la clínica para tratar la espasticidad y mejorar la movilidad en pacientes con esclerosis múltiple y otras lesiones de la médula espinal, sin afectar la transmisión neuromuscular.

En ensayos animales reduce la autoadministración de cocaína (Roberts, 2005), el reestablecimiento de la conducta tras su extinción (Campbell *et al*, 1999) y el comportamiento de búsqueda (Di Ciano and Everitt, 2003). Estos efectos están probablemente mediados por su capacidad de antagonizar la liberación de DA inducida por cocaína en el NAc (Fadda *et al*, 2003).

Un ensayo clínico realizado en laboratorio ha mostrado que la administración de baclofén redujo la autoadministración de cocaína en sujetos no dependientes de opiodes (Haney *et al*, 2006). Sin embargo, un estudio reciente ha revelado que el tratamiento no ayuda en el inicio de la abstinencia a pacientes con una fuerte dependencia por la droga (Kahn *et al*, 2009).

- Vigabatrina

La vigabatrina es una anticonvulsionante que incrementa la neurotransmisión de GABA por inhibición de la GABA transaminasa, enzima encargada de la metabolización del neurotransmisor.

En modelos animales de adicción, reduce la autoadministración de cocaína y la liberación de DA inducida por la droga en el NAc (Gerasimov *et al*, 2001; Kushner *et al*, 1999).

Estudios clínicos con pacientes dependientes tanto de cocaína como de metanfetamina a los que se les administró el tratamiento durante 9 semanas, mostraron que la medicación fue bien tolerada y que aumentó la probabilidad de que los sujetos se mantuvieran abstinentes (Brodie *et al*, 2003; Brodie *et al*, 2005; Fechtner *et al*, 2006). A pesar de esto, la vigabatrina no es comercializada en algunos países como en Estados Unidos debido a la aparición de problemas oftalmológicos, aunque ninguno fue detectado a corto plazo durante la realización de los ensayos (Fechtner *et al*, 2006; Hawker and Astbury, 2008).

- Tiagabina

La tiagabina es un anticonvulsionante que incrementa la neurotransmisión de GABA, bloqueando la captura del neurotransmisor, que se ha utilizado para el tratamiento de la epilepsia.

Mientras que la facilitación de la actividad GABA muestra evidencias de reducción en el consumo de cocaína es interesante destacar que la tiagabina, que bloquea la liberación presináptica de GABA, también disminuyó el consumo de cocaína e incrementó las tasas de abstinencia en dos ensayos clínicos controlados (Gonzalez *et al*, 2003; Gonzalez-Cuevas *et al*, 2007).

2.1.2 Agentes dopaminérgicos

- Bupropión

El bupropión es un fármaco antidepresivo aprobado como tratamiento para la adicción a la nicotina. Es un débil inhibidor del transportador de DA presináptico con efectos estimulantes en modelos animales, sin embargo, el mecanismo mediante el cual realiza su acción terapéutica no está claro.

En un ensayo clínico llevado a cabo en sujetos tratados también con metadona como medicación para la dependencia a opioides, los pacientes recibían una recompensa económica cada vez que demostraban, mediante pruebas de orina, que no habían consumido cocaína. La administración de bupropión potenció la recompensa de obtener un resultado negativo en los tests, reduciendo el consumo

de cocaína, mientras que no presentó ningún efecto en aquellos pacientes que recibieron la recompensa de manera no contingente (Poling et al, 2006).

- Antagonistas y agonistas dopaminérgicos parciales

La cocaína actúa bloqueando el sistema dopaminérgico, de manera que el bloqueo de los receptores de DA podría ser una aproximación plausible para el diseño de medicaciones que trataran la dependencia a esta droga.

Una primera generación de neurolépticos, que actúan como antagonistas de los receptores D2 de DA, no fueron efectivos en la reducción del consumo de cocaína en pacientes que también padecían de esquizofrenia (Green, 2005). Sin embargo, estudios clínicos que están testando la segunda generación de neurolépticos y entre los que destacan la risperidona y la olanzapina, ambos empleados en el tratamiento de la esquizofrenia, han mostrado que ambos fármacos redujeron la euforia inducida por cocaína así como el *craving* desencadenado por la presencia de estímulos asociados a la droga (Newton et al, 2001; Smelson et al, 2002; Smelson et al, 1997; Smelson et al, 2004; Smelson et al, 2006), aunque no fueron capaces de reducir el consumo (Grabowski et al, 2004a; Kampman et al, 2003; Reid et al, 2005). El aripiprazole, otro neuroléptico de segunda generación, actúa como antagonista parcial de receptores tanto D2 de DA como serotonina 5-HT_{1A}, los cuales regulan la liberación de DA (El-Sayeh et al, 2006). En modelos animales de recaída, se ha comprobado que bloquea el reestablecimiento de la conducta de autoadministración tras un periodo de extinción (Feltenstein et al, 2007). En un estudio piloto realizado en pacientes dependientes de cocaína, que además padecían esquizofrenia, la administración de aripiprazole dio como resultado una disminución en el *craving* por cocaína (Beresford et al, 2005). Ensayos clínicos con sujetos dependientes a esta droga se están llevando a cabo para evaluar con más profundidad este resultado.

- Levodopa/Carbidopa

La combinación levodopa y carbidopa es el tratamiento aislado más eficaz en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. La combinación de ambos fármacos es una estrategia de reemplazo de DA. La levodopa no puede atravesar la barrera hematoencefálica pero la coadministración de carbidopa facilita su transporte hacia el cerebro y su posterior transformación en DA.

En tres ensayos clínicos en los que se administraron diferentes dosis de levodopa en pacientes dependientes de cocaína, no se observó ninguna reducción en el consumo o en el *craving* por la sustancia (Mooney *et al*, 2007; Shoptaw *et al*, 2005).

2.1.3. Medicaciones sustitutivas

Otro enfoque en el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes ha sido la evaluación de drogas con propiedades farmacológicas muy similares a las de las mismas drogas de abuso, con el objetivo de suprimir los síntomas que aparecen durante el periodo de abstinencia y prevenir la recaída. Este enfoque es lo que se ha denominado “terapia agonista de reemplazo” (Grabowski *et al*, 2004b).

Una prueba de la efectividad de esta terapia es el empleo de metadona para el tratamiento de la dependencia a la heroína. En otros casos, la utilización de la misma droga, con una formulación menor, como es el caso de los parches o chicles de nicotina para el tratamiento de la dependencia al tabaco, también puede ser eficaz (Gorelick, 1998). La Organización Mundial de la Salud está explorando el uso de medicaciones sustitutivas como medida terapéutica para tratar el problema de la adicción a psicoestimulantes y hasta la fecha ya se han realizado estudios clínicos con sustancias como metilfenidato, modafinil, disulfiram, d-anfetamina y cocaína oral.

Tabla 3.- Ensayos clínicos controlados con potenciales agentes terapéuticos en pacientes adictos a la cocaína y/o metanfetamina. Tabla modificada de (Yahyavi-Firouz-Abadi and See, 2009)

Clase	Droga	Pacientes	Diagnóstico	Resultado	Referencias
GABA	Baclofén	70	Dependientes cocaína	↓ uso en pacientes con alto consumo	Shoptaw, 2003
		115	Dependientes severos cocaína	Test orina negativo	Kahn, 2009
	Tiagabina	45	Dependientes cocaína y opiáceos con mantenimiento de metadona	↑ test orina negativos	Gonzalez, 2003
		50	Dependientes cocaína y opiáceos con mantenimiento de metadona	↓ consumo cocaína ↑ tasa abstinencia	Gonzalez, 2007
	Topiramato	40	Dependientes cocaína	↑ tasa abstinencia	Kampman, 2004
	Vigabatrina	20	Dependientes cocaína o metanfetamina	↑ tasa abstinencia	Brodie, 2003
		30	Dependientes cocaína o metanfetamina	↑ test orina negativos	Brodie, 2005
Dopamina	Bupropión	106	Dependientes cocaína y opiáceos con mantenimiento de metadona	↑ test orina negativos	Poling, 2006
		151	Dependientes metanfetamina	↑ ratio abstinencia	Elkashef, 2008
	Disulfirám	122	Dependientes cocaína y alcohol	↑ duración abstinencia	Carroll, 1998
		20	Dependientes cocaína y opiáceos con mantenimiento de buprenorfina	↑ duración abstinencia	George, 2000
		67	Dependientes cocaína y opiáceos con mantenimiento de metadona	↓ consumo según autoinformes	Petrakis, 2000
		121	Dependientes cocaína	↑ test orina negativos	Carroll, 2004
	Levodopa/ Carbidopa	161	Dependientes cocaína	↑ test orina negativos en pacientes tratados con terapia de refuerzo basada en cupones	Schmitz, 2008
Opioides	Buprenorfina	178	Dependientes cocaína y opiáceos	↑ test orina negativo	Montoya, 2004
Serotonina/ Norepinefrina	Desipramina	160	Dependientes cocaína y opiáceos con mantenimiento de metadona	↑ test orina negativos	Kosten, 2003
Serotonina	Citalopram	76	Dependientes cocaína	↑ test orina negativos	Moeller, 2007
Norepinefrina	Propanolol	108	Dependientes cocaína	↑ duración abstinencia	Kampman, 2001
		199		↓ síntomas abstinencia	Kampman, 2006
Glutamato (?)	Modafinil	62	Dependientes cocaína	↑ test orina negativos	Dackis, 2005
		210		↑ test orina negativos en pacientes sin dependencia a alcohol	Anderson, 2009
Vacuna	TA-CD	18	Dependientes cocaína	↑ test orina negativos	Martell, 2005

- Metilfenidato

El metilfenidato está aprobado para su uso en clínica como medicación para el tratamiento del trastorno de hiperactividad y déficit de atención (ADHD). Tiene afinidad por el transportador de DA y NA pero no por el 5-HT, de manera que bloquea la captura de ambos neurotransmisores e incrementa su liberación en el espacio sináptico.

Dado que el metilfenidato es un medicamento efectivo en el tratamiento de ADHD, se hipotetizó que podría tener efectos beneficiosos en pacientes dependientes de cocaína que además sufrieran de este trastorno. Los resultados de estos ensayos clínicos han mostrado efectos contrarios dependiendo de cómo se produce la liberación de los neurotransmisores. Por una parte, la administración de metilfenidato que inducía una liberación de neurotransmisores inmediata, no redujo el consumo ni el *craving* por la droga aunque sí mejoró los síntomas relacionados con ADHD (Schubiner *et al*, 2002). En cambio en otro estudio en el que el metilfenidato producía una liberación de neurotransmisores de manera gradual, se observó un descenso significativo en el consumo de cocaína, siendo mayor en pacientes que también habían experimentado una mayor mejoría en los síntomas relacionados con ADHD (Levin *et al*, 2007). Estos resultados sugieren que una liberación de neurotransmisores mantenida puede ser más eficaz que una liberación inmediata y esta eficacia es debida en parte a una reducción en los síntomas de ADHD.

Al igual que la cocaína, el metilfenidato es un estimulante cardiovascular con potencial para producir daños cardiacos. En un estudio de interacción llevado a cabo en individuos con ADHD y adictos a la cocaína, se observó que la administración de metilfenidato potenció la respuesta cardiovascular inducida por la administración intravenosa de cocaína, aunque no hasta el punto de tener que suspender el ensayo (Collins *et al*, 2006). Otros estudios revelaron que la administración de metilfenidato que producía una liberación de neurotransmisores de manera rápida, tenía un potencial de abuso

mucho mayor que aquella que producía una liberación lenta (Arria and Wish, 2006; Greenhill, 2006; White *et al*, 2006).

- Modafinil

El modafinil es un neuroestimulante indicado para el tratamiento de somnolencia excesiva asociada con narcolepsia y desórdenes del sueño (Bastuji and Jouvett, 1988; Billiard *et al*, 1994; Laffont *et al*, 1994). Este fármaco es capaz de unirse tanto al transportador de DA como de NA a dosis clínicamente relevantes (Madras *et al*., 2006; Mignot *et al*., 1994), hecho que es consistente con su acción estimulante. Además, parece incrementar la liberación de glutamato y decrementar la de GABA (Ballon and Feifel, 2006).

La actividad de carácter estimulante inducida por el modafinil, puede reducir los síntomas asociados con la abstinencia de cocaína incluyendo el letargo, la disforia, el daño cognitivo o el incremento en el apetito, reduciendo de esta manera el deseo de volver a consumir de nuevo (Dackis *et al*, 2003). Se ha observado que tiene un débil efecto reforzante en animales (Deroche-Gamonet *et al*, 2002) y un efecto estimulante subjetivo en humanos (Rush *et al*, 2002a; Rush *et al*, 2002b). Visto así, el uso de modafinil como terapia sustitutiva para el tratamiento de la dependencia a la cocaína, podría ser análogo a la utilización de metadona o buprenorfina para el tratamiento de la dependencia a la heroína. Como se muestra en la tabla 3, se han aportado evidencias que muestran que el modafinil reduce el consumo de cocaína, en comparación con placebo (Dackis *et al*, 2005). Sin embargo, un ensayo realizado recientemente ha revelado que este efecto es sólo significativo en pacientes no dependientes del alcohol (Anderson *et al*, 2009). Tampoco se han encontrado evidencias que indiquen que el modafinil produzca euforia o *craving* (Ballon *et al*, 2006; O'Brien *et al*, 2006), sugiriendo que puede tener un bajo potencial de abuso (Jasinski, 2000; Jasinski and Kovacevic-Ristanovic, 2000). Adictos a la cocaína son capaces de discriminar entre la droga y el modafinil, sin reportar ningún efecto eufórico de este último (Rush *et al*, 2002b). Otros estudios de laboratorio realizados en humanos, han indicado que no

aparecieron interacciones adversas significativas entre la cocaína y el modafinil (Dackis *et al*, 2003; Donovan *et al*, 2005; Malcolm *et al*, 2006).

- Disulfiram

El disulfiram se ha empleado durante más de un siglo como tratamiento para el alcoholismo (Suh *et al*, 2006). Inhibe la aldehído deshidrogenasa, enzima encargada de transformar el acetaldehído en acetato, durante el metabolismo del alcohol. Cuando se ingieren las dos sustancias simultáneamente se producen reacciones adversas, consecuencia de la acumulación de acetaldehído, como son náuseas, dolores de cabeza, taquicardias, palpitaciones, hiperventilación, sudores, etc., disuadiendo de un consumo de alcohol posterior. Además, inhibe la dopamina β -hidrolasa, enzima encargada de transformar la DA en NA, inhibición que incrementa los niveles de DA y disminuye los de NA en el sistema nervioso. Es este efecto inhibitorio el que se ha considerado como un posible efecto terapéutico para el tratamiento de la dependencia a la cocaína (Karila *et al*, 2008).

Uno de los motivos iniciales por los que se pensó en utilizar el disulfiram como medicación para tratar la dependencia a la cocaína, fue el hecho de que un alto porcentaje de personas que consumían la droga eran además dependientes del alcohol (Gossop and Carroll, 2006), de manera que se postuló que una reducción en el consumo de alcohol iría acompañada de una disminución en el consumo de cocaína. Además, el cese en el consumo de alcohol prevendría la formación de cocaetileno, un metabolito formado cuando se produce un consumo combinado de alcohol y cocaína. Este metabolito posee las mismas propiedades farmacológicas que la cocaína pero con un efecto más duradero (Hart *et al*, 2000).

Como indica la tabla 3, se ha evidenciado que la administración de disulfiram reduce el consumo de cocaína independientemente de si los sujetos son además dependientes de alcohol u opioides (Carroll *et al*, 1998; George *et al*, 2000; Higgins *et al*, 1993; Petrakis *et al*, 2000). Sin embargo, a pesar de estos resultados

el uso de disulfiram como medicación para el tratamiento de la adicción a la cocaína ha empezado a cuestionarse. Estudios de laboratorio en pacientes dependientes han mostrado que el disulfiram inhibe el metabolismo de la cocaína, lo que se traduce en un incremento de la droga en plasma cuando ambas sustancias son administradas (Baker *et al*, 2007). Esto se ha asociado con un incremento en las respuestas cardiovasculares inducidas por la cocaína. La recaída en el consumo de cocaína o alcohol mientras se está siguiendo un tratamiento con disulfiram puede producir serios daños, incluso irreversibles, de manera que debe limitarse su uso a pacientes con una elevada motivación por dejar de consumir, apoyo social que disminuya las posibilidades de una recaída y una buena salud (Karila *et al*, 2008; Malcolm *et al*, 2006).

- d-Anfetamina

La dextroanfetamina se une a los transportadores de DA y NA promoviendo la liberación de estos neurotransmisores. Se ha observado que en monos *Rhesus* disminuye la autoadministración de cocaína (Negus and Mello, 2003). Un estudio llevado a cabo con pacientes dependientes de cocaína o cocaína y heroína, ha mostrado que la dosis más alta testada disminuyó el consumo de cocaína (Grabowski *et al*, 2001; Grabowski *et al*, 2004a; Shearer *et al*, 2003).

- Formulaciones orales de cocaína

Masticar hoja de coca u otro tipo de formulación oral de la cocaína, como infusiones y comprimidos, son prácticas comunes en regiones como Bolivia, Perú y Colombia.

Un estudio de laboratorio realizado en humanos encontró que un pretratamiento con cocaína oral disminuía las respuestas subjetivas y fisiológicas de una administración intravenosa (Walsh *et al*, 2000). Se han descrito evidencias que indican que infusiones de hojas de cocaína tienen propiedades que disminuyen el *craving* en adictos a la droga (Siegel *et al*, 1986; Weil, 1978), aunque son

necesarios más ensayos clínicos para evaluar el potencial terapéutico real de este enfoque como tratamiento.

2.1.4. Otras medicaciones en fase de ensayo clínico

- Vacunas

El desarrollo de vacunas que se unen a la cocaína, metanfetamina, fenilciclina o morfina, han constituido un enfoque diferente en el diseño de fármacos para tratar el problema de la adicción a las drogas (Orson *et al*, 2008). La vacuna utiliza anticuerpos anticocaína que se unen a las moléculas de droga, bloqueando o reduciendo la tasa de entrada en el sistema nervioso central. Los complejos formados por moléculas de anticuerpo unidos a moléculas de cocaína tienen un tamaño demasiado grande como para poder atravesar la barrera hematoencefálica, de manera que mantienen a la cocaína fuera de su lugar de acción en el sistema nervioso central (Kosten and Biegel, 2002). Para garantizar la eficacia de este nuevo tratamiento se han planteado ciertas ventajas que debe de cumplir frente a las otras terapias ya existentes: (1) no producir efectos psicoactivos y por lo tanto no tener potencial de abuso y (2) tener efectos terapéuticos persistentes durante meses, garantizando la eficacia del tratamiento (Kosten and Owens, 2005). La desventaja que se ha planteado es el tiempo que transcurre desde que se administra la vacuna hasta que se alcanzan los niveles de anticuerpos adecuados.

Se ha visto que en modelos animales, la vacuna reduce significativamente algunos de los efectos comportamentales inducidos por la cocaína. Concretamente se ha demostrado que la vacuna puede producir un número adecuado de anticuerpos que inhiben tanto el reestablecimiento de la conducta de autoadministración, como la actividad locomotora tras una reexposición a la droga (Carrera *et al*, 2000; Norman *et al*, 2009).

En la primera fase de un ensayo en humanos, se observó que tras 12 meses la vacuna inducía anticuerpos anticocaína de manera dependiente del

tiempo transcurrido y dosis administrada. La vacuna fue bien tolerada por los sujetos y ningún efecto adverso relevante fue descrito (Kosten *et al*, 2002). Estudios más recientes han revelado que la administración de la vacuna reduce significativamente los efectos inducidos por la cocaína y reduce el consumo, exhibiendo al mismo tiempo seguridad y eficacia (Orson *et al*, 2008).

- N-acetil cisteína

Este compuesto está indicado para el tratamiento de complicaciones pulmonares derivadas de la fibrosis quística o en casos de sobredosis de paracetamol.

En modelos animales se ha observado que el consumo crónico de cocaína disminuye los niveles basales de glutamato en el NAc (Baker *et al*, 2003a). Se ha comprobado que la administración de N-acetil cisteína puede promover el intercambio de cisteína extracelular por glutamato intracelular, incrementando de esta manera los niveles de este neurotransmisor. Asimismo, en modelos animales de recaída, se ha observado que el tratamiento con este compuesto reduce el reestablecimiento de la conducta de autoadministración de cocaína (Baker *et al*, 2003b).

Estudios clínicos han mostrado que todas las dosis administradas de N-acetil cisteína fueron bien toleradas por los pacientes y no ocasionaron efectos secundarios, además de aportar evidencias de disminución del *craving* por cocaína, reducir los síntomas de la abstinencia y el consumo de la droga (LaRowe *et al*, 2006; Mardikian *et al*, 2007).

- Ondansetrón

El ondansetrón es un antagonista del receptor de serotonina 5-HT₃, aprobado como agente antiemético. La activación del receptor 5-HT₃ incrementa la actividad dopaminérgica en el NAc (Dremencov *et al*, 2006), sugiriendo que el bloqueo de estos receptores podría considerarse un buen enfoque terapéutico.

Ensayos preliminares en humanos han mostrado que las dosis de ondansetrón empleadas fueron bien toleradas por los sujetos, y en concreto una de ellas (4.0 mg dos veces/día) mostró tasas más bajas de abandono del estudio y un porcentaje más elevado de participantes que no consumieron droga durante el tiempo en el que éste se estaba realizando, en comparación con otras dosis y grupo que recibió placebo (Johnson *et al*, 2006).

2.2- MEDICACIONES EMPLEADAS EN EL TRATAMIENTO DE LA DEPENDENCIA A LA ANFETAMINA

La facilidad con la que se pueden sintetizar anfetaminas a partir de compuestos químicos disponibles y no muy caros, puede influir en el hecho de que el consumo y la dependencia a estas drogas esté incrementando. El consumo de anfetaminas es un problema debido a la gran variedad de consecuencias sobre la salud que acarrea su abuso, incluyendo trastornos físicos y neurológicos.

Varios compuestos, entre los que se encuentran la fluoxetina, la amlodipina, la imipramina y la desipramina, han sido testados en ensayos clínicos. Ninguno de estos fármacos es específico para el tratamiento de la dependencia a las anfetaminas y las evidencias que han aportado son bastante limitadas. En concreto, la fluoxetina redujo el *craving* tras un tratamiento a corto plazo, mientras que la imipramina incrementó el tiempo en que los sujetos cumplían las pautas del tratamiento. Además de estos limitados beneficios, ninguno de los otros fármacos ha demostrado la efectividad necesaria para poder ser considerado un tratamiento con potencial terapéutico (Srisurapanont *et al*, 2001). Actualmente se están explorando activamente otros tratamientos que podrían ser útiles como la dextroanfetamina. Un estudio con pacientes que consumían metanfetamina, ha revelado resultados positivos a la hora de reducir el *craving* y los síntomas de abstinencia, así como de mantener la adherencia de los sujetos al tratamiento, a pesar de que no redujo los niveles de consumo de metanfetamina comparado con el

grupo que recibió placebo (Galloway *et al*, 2011; Longo *et al*, 2010). Los estudios que evaluaron la eficacia del modafinil en personas dependientes de metanfetamina, encontraron posibles mejoras relacionadas con la memoria, pero ningún efecto de mejoría relacionado con el nivel de consumo, mantenimiento del tratamiento, depresión o *craving* (Heinzerling *et al*, 2010; Kalechstein *et al*, 2010). El bupropión, en combinación con una terapia de grupo, incrementó el número de semanas que los sujetos se mantenían abstinentes (Elkashef *et al*, 2008), aunque se necesitan estudios complementarios para confirmar los resultados positivos obtenidos.

El enfoque de la inmunización ensayado previamente para abordar la adicción a la cocaína, ha empezado a testarse en modelos animales de adicción a la metanfetamina. En varios ensayos se ha observado que el uso de anticuerpos monoclonales anti-metanfetamina pueden atenuar o incrementar, en función de la dosis, la tasa de SA de la droga, sugiriendo su eficacia como antagonistas farmacocinéticos (Duryee *et al*, 2009; McMillan *et al*, 2004).

En cuanto a los tratamientos existentes para abordar la abstinencia a las anfetaminas, tampoco se encuentran muchos estudios. Hasta la fecha se han estudiado compuestos como la amineptina, un inhibidor de la recaptura de DA con efectos farmacológicos similares a los de la anfetamina (Samanin *et al*, 1977) y la mirtazapina, un antidepresivo que mejora la actividad noradrenérgica y serotoninérgica, debido al bloqueo selectivo de receptores α_2 , 5-HT₂ y 5-HT₃ (De Boer, 1996). Sin embargo, los resultados de estos ensayos no han aportado evidencias que sugieran que estas sustancias puedan ser efectivas para el tratamiento de la abstinencia tras un consumo crónico de anfetaminas (Cruickshank *et al*, 2008; Kongsakon *et al*, 2005).

2.3. MEDICACIONES EN FASE PRECLÍNICA

A pesar de que la dependencia a psicoestimulantes es un problema creciente con elevados costes directos e indirectos para la sociedad, hasta la fecha el desarrollo de medicaciones adecuadas no ha sido satisfactorio. Sin embargo, los esfuerzos por identificar y desarrollar tratamientos o moléculas que puedan ser eficaces no cesan y actualmente varios de estos nuevos compuestos están siendo testados en modelos preclínicos aparentemente con buenos resultados. Dentro de estas nuevas sustancias encontramos antagonistas de receptores D3, liberadores duales de dopamina-serotonina, antagonistas de receptores cannabinoides CB1, antagonistas de receptores del factor de liberación de corticotropina e inhibidores de la captura de dopamina.

Los estudios realizados con antagonistas D3 han mostrado que inhiben la búsqueda de droga inducida por cocaína (Cervo *et al*, 2007), así como la autoadministración de cocaína en roedores, pero no en primates (Cervo *et al*, 2007; Martelle *et al*, 2007). Un agonista parcial del receptor D3, CJB090, bloquea los efectos discriminativos y reforzantes de la cocaína, sin producir efectos similares (Martelle *et al*, 2007).

Basándose en evidencias aportadas a través de estudios que permiten comprender mejor los sustratos neurobiológicos que subyacen al fenómeno de la adicción y abstinencia, sustancias que produjeran una liberación de DA y 5-HT, podrían constituir un acercamiento adecuado para el tratamiento de estos trastornos. Como se ha explicado en el primer capítulo, la abstinencia a determinadas sustancias como cocaína, morfina, alcohol o nicotina, produce un déficit en el nivel de neurotransmisores, de manera que la administración de este tipo de medicaciones puede compensar este decremento. Estudios en primates han mostrado que uno de los candidatos testados, PAL287, ha resultado ser mínimamente reforzante por sí mismo, así como capaz de suprimir la conducta de autoadministración de cocaína (Rothman *et al*, 2006b).

Los receptores cannabinoides CB₁ modulan los efectos de la liberación de DA y están implicados en el fenómeno de recaída en la búsqueda de muchas sustancias adictivas (Maldonado *et al*, 2006). El bloqueo de estos receptores mediante la administración de antagonistas inhibe, en animales, la búsqueda de cocaína inducida por la misma droga o por estímulos previamente asociados a ella (Xi *et al*, 2006). Además, son sustancias no autoadministradas por los animales, sugiriendo muy poco o ningún potencial de abuso (Beardsley *et al*, 2002).

El factor liberador de corticotropina (CRF) es un neuropéptido que promueve la liberación de la hormona corticotropina (ACTH) en respuesta al estrés. La autoadministración de cocaína en monos *Rhesus* estimula la liberación de la hormona y activa el eje hipotalámico-hipofisario adrenal (Broadbear *et al*, 2004). La administración de este factor de liberación promovió el reestablecimiento de la conducta de autoadministración de cocaína tras un periodo de extinción (Erb and Brown, 2006), mientras que la administración de un antagonista selectivo del receptor CRF₁, CP154,526, produjo el efecto inverso (Przegalinski *et al*, 2005).

Una de las líneas de investigación más estudiadas ha sido el desarrollo de inhibidores de la captura de DA que puedan actuar como antagonistas de la cocaína con características farmacológicas diferentes, es decir, menor potencial estimulante y mayor duración de los efectos. En el siguiente capítulo desarrollaremos este apartado centrándonos en una de estas familias de moléculas, los análogos de la benzotropina, caracterizando algunos de sus compuestos como objetivo central de este trabajo.

3.-INHIBIDORES ATÍPICOS DE LA CAPTURA DE DOPAMINA: ANÁLOGOS DE LA BENZOTROPINA

3.1- EL DAT COMO DIANA FARMACOLÓGICA DE SUSTANCIAS CON POTENCIAL TERAPÉUTICO PARA EL TRATAMIENTO DE LA ADICCIÓN A PSICOESTIMULANTES: INHIBIDORES ATÍPICOS DE LA CAPTURA DE DOPAMINA.

Se ha hipotetizado que medicaciones que actúen bloqueando el transportador de DA podrían tener efectos reforzantes similares a los producidos por drogas psicoestimulantes (Kuhar *et al*, 1991). Sin embargo, varias clases de inhibidores de la captura de DA sintetizados en los pasados 15-20 años han mostrado tener efectos comportamentales que difieren de los producidos por estimulantes clásicos como la cocaína, a pesar de compartir y competir por la misma diana (Newman and Kulkarni, 2002). Debido a estas características, estos inhibidores “atípicos” de la recaptura de DA están siendo activamente investigados con el fin de encontrar características clave que puedan ayudar en la búsqueda y desarrollo de medicaciones eficaces para el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes.

Como se ha comentado previamente, las terapias de sustitución o las que emplean medicaciones agonistas, han proporcionado resultados satisfactorios en el tratamiento de la dependencia a opioides y nicotina (Mattick *et al*, 2009; Stead *et al*, 2008). En base a estas evidencias, fármacos que actúen bloqueando el transportador pero con un potencial de abuso menor que la propia droga, constituyen el objetivo de una intensa investigación con la que se pretende descubrir y desarrollar moléculas que en el futuro puedan ser usadas como tratamiento. Una de las sustancias más estudiadas ha sido el GBR 12909. A pesar de tener algunas características farmacológicas comunes con moléculas psicoestimulantes adictivas, presenta efectos preclínicos que sugieren que puede

ser efectiva como tratamiento clínico. Posee una elevada afinidad por el DAT e inhibe selectivamente la captura de DA mostrando una pauta lenta y duradera de acción farmacológica, en comparación con estimulantes como la cocaína (Rothman *et al*, 1992; Rothman *et al*, 1991). Estudios de microdiálisis *in vivo* realizados en ratas demostraron que la administración de GBR 12909 produce un suave incremento en los niveles extracelulares de DA. Además, es capaz de competir con otros psicoestimulantes como la cocaína o anfetamina, por el lugar de unión al transportador, bloqueando el aumento en el nivel de neurotransmisor inducido por las drogas (Baumann *et al*, 1994; Rothman *et al*, 1991). Estudios de autoadministración en ratas y monos *Rhesus* revelaron que el GBR 12909 administrado como pretratamiento producía una reducción en el consumo de cocaína de manera dependiente de la dosis, sin mostrar ningún efecto sobre el consumo de alimento (Glowa *et al*, 1995a; Schenk, 2002; Stafford *et al*, 2001; Tella, 1995). Sin embargo, estudios con otras moléculas de la misma familia, han demostrado que no todos los inhibidores de la captura de DA pueden ser efectivos como potenciales medicaciones agonistas. Uno de los ejemplos es el caso del compuesto GBR 12935 que, a dosis en las que disminuye la autoadministración de cocaína, también altera la respuesta por alimento (Glowa *et al*, 1995b). Ensayos posteriores realizados con el compuesto GBR 12909, confirmaron que era autoadministrado y capaz de reiniciar la búsqueda de droga después de un periodo de extinción, tanto en ratas como en primates no humanos (De Vries *et al*, 1999; Roberts, 1993; Woolverton *et al*, 2001). Estudios realizados en humanos no confirmaron este potencial de abuso (Preti, 2000; Sogaard *et al*, 1990) pero en cambio, en todos los pacientes tratados con el compuesto, aparecieron efectos cardiovasculares que obligaron a la interrupción de la fase I del ensayo clínico (Vocci *et al*, 2005a).

La parte central y objetivo de esta tesis es la caracterización psicofarmacológica de compuestos análogos a la benzotropina (BZT). Como se observa en la figura 5, la molécula original de benzotropina comparte características estructurales comunes tanto con la molécula de cocaína como con la de GBR 12909, razón por la cual ha sido considerada una molécula de interés.

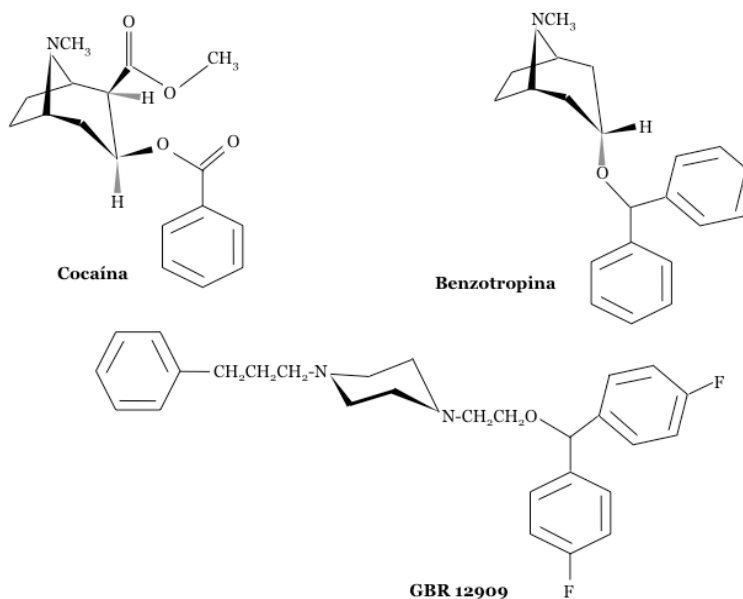


Figura 5.- Estructura química de la molécula de cocaína, BZT y GBR 12909. Figura modificada de (Newman and Katz, 2009).

Comercializada bajo el nombre de Cogentina®, se trata de un anticolinérgico y antihistamínico utilizado en el tratamiento de los primeros síntomas asociados con la enfermedad de Parkinson (Grace, 1997). Es un inhibidor de la captura de DA (Coyle and Snyder, 1969), equipotente a la cocaína, que exhibe propiedades estimulantes en modelos animales (Acri *et al*, 1993; McKearney, 1982). Además, y aunque no era el objetivo inicial del estudio, Colpaert demostró

que la BZT no sustituía en ratas que habían sido entrenadas a discriminar entre inyecciones de solución salina y cocaína (Colpaert *et al*, 1979). La combinación del anillo tropano, presente en la cocaína, con el grupo difenil éter encontrado en las moléculas de la familia GBR, como por ejemplo en el GBR 12909, sugiere que la BZT puede servir de patrón para el diseño de una nueva generación de inhibidores de la captura de DA que carezcan del efecto estimulante. Debido a esto, en los últimos 15 años se han sintetizado y evaluado exhaustivamente en modelos animales numerosos compuestos derivados de la BZT (Tabla 4) (Dar *et al*, 2005; Desai *et al*, 2005a; Kulkarni *et al*, 2004; Kulkarni *et al*, 2006; Reith *et al*, 2001; Ukairo *et al*, 2005). Por las evidencias descritas, estos compuestos pueden ser de potencial interés por su diferente modo de acción sobre el DAT, en comparación con los tradicionales inhibidores de la captura de DA. Sin embargo, hay que mencionar que los análogos de la BZT no son la única familia de inhibidores de la captura que presentan efectos farmacológicos que difieren de los de la cocaína. Por ejemplo, el rimcazole, un antagonista del receptor sigma e inhibidor del DAT, no induce efectos similares a los producidos por la cocaína (Cao *et al*, 2003; Husbands *et al*, 1999; Katz *et al*, 2003). Asimismo, otros compuestos también con una elevada afinidad por el DAT, como el RTI-371, han mostrado tener una baja eficacia como inductores de la actividad locomotora y capacidad de antagonizar la hiperestimulación producida por la cocaína (Navarro *et al*, 2005). Estos datos son consistentes con la idea de que la unión al transportador de DA y la consecuente inhibición en la captura, no produce en todos los casos efectos similares a los inducidos por los psicoestimulantes clásicos.

Tabla 4.- Datos de binding de los análogos de la BZT sobre el DAT, SERT, NET, M1 y H1.Tabla modificada de (Newman *et al*, 2009).

Compuesto	Grupo	R',R''	DAT	SERT	NET	M1	H1
Cocaína			187 (18.7)	172 (15)	3210 (149)	61400 (10900)	1050 (43)
GBR 12909			12 (1.9)	105 (11.4)	497 (17)		
BZT	CH ₃	H,H	118 (10.6)	31600 (5160)	1390 (134)	2.1 (0.29)	15.7 (2.13)
AHN 1-055	CH ₃	4',4''-diF	11.8 (1.3)	3260 (110)	610 (805)	11.6 (0.93)	19.7 (1.32)
AHN 2-055	allyl	4',4''-diF	29.9 (3)	2850 (62.5)	1740 (242)	177 (21)	24.9 (1.16)
JHW 007	butyl	4',4''-diF	24.6 (2)	1350 (151)	1670 (232)	399 (28.6)	
JHW 005	benzyl	4',4''-diF	82.2 (12.3)		2080	1030 (150)	
JHW 025	(CH ₃) ₂ I	4',4''-diF	108 (13)	1220 (166)	3350 (534)	11.8 (0.58)	
JHW 013	cyclopropylmethyl	4',4''-diF	32.4 (2.9)	1420 (116)	1640 (153)	136 (11)	
3',4'-diF-BZT	CH ₃	3,4-diF, H	27.9 (11)			3.79 (9)	
GA 1-03	4''-phenyl-N-butyl	4',4''-diF	8.51 (1.2)	376 (51.8)	2210 (240)	576 (10.7)	141 (6.72)
GA 1-69	indol-3''-ethyl	4',4''-diF	44.6 (4.9)	490 (56.4)	7350 (934)	3280 (220)	333 (22.6)
GA 2-50	2''-amino-3''-methyl-N-butyl	4',4''-diF	56.4 (9.6)	3870 (135)	2130 (160)	4020 (592)	218 (15.5)
GA 2-99	2''-aminoethyl	4',4''-diF	13.9 (1.7)	4600 (680)	1420 (130)	1250 (138)	240 (32.6)
4'-Cl-BZT	CH ₃	4'-diCl	30 (3.6)	5120 (395)	1470 (180)	1.48 (0.02)	
4',4''-diCl-BZT	CH ₃	4',4''-diCl	20 (2.8)	1640 (236)	2980 (182)	47.9 (5.18)	122 (4.5)
3'-Cl-BZT	CH ₃	3'-diCl	21.6 (1.51)	258 (19.1)	451 (62.5)	0.98 (0.01)	
3',4''-diCl-BZT	CH ₃	3',4''-diCl	32.5 (4.88)	3870 (239)	1660 (239)	21.5 (2.63)	

3.2. ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

Los compuestos derivados de la BZT presentan afinidad por el transportador de DA, estando ésta relacionada con variaciones en la estructura de la molécula. Además, la mayoría de estos análogos son selectivos para el DAT en comparación con otros transportadores de monoaminas. Este hecho, siguiendo la hipótesis de Kuhar, que plantea que las drogas que bloquean el transportador de DA deben tener propiedades reforzantes, conferiría a estas moléculas efectos comportamentales similares a los de la cocaína (Kuhar *et al*, 1991). Sin embargo, estudios de laboratorio con varios modelos animales de adicción a psicoestimulantes, han demostrado que estos análogos de la BZT son menos efectivos que las propias drogas.

3.2.1. Actividad locomotora

Las drogas adictivas ejercen en gran medida sus propiedades reforzantes a través de la activación de sistemas cerebrales asociados con comportamientos normales como la exploración o la actividad locomotora. Este comportamiento está mediado por la habilidad de estos compuestos de influir en la transmisión dopaminérgica en áreas cerebrales específicas (Zahm, 1999). Debido a que la estimulación locomotora es una variable relativamente fácil de obtener, este test se ha utilizado con frecuencia para investigar los posibles efectos estimulantes de diferentes compuestos, a pesar de que la actividad locomotora no está directamente relacionada con los efectos reforzantes.

Se ha investigado ampliamente que otros inhibidores del DAT como la cocaína, metilfenidato, mazindol o nomifensina, ejercen un efecto en la actividad locomotora de manera dependiente de la dosis, que puede ser gráficamente representado como una U invertida. Las dosis bajas e intermedias producen un incremento en la actividad locomotora mientras que dosis más elevadas la disminuyen debido posiblemente a la presencia de otros comportamientos motores perseverativos, como estereotipias o convulsiones, síntomas incompatibles en muchos de los casos con la locomoción (Bhattacharyya and Pradhan, 1979; Roy *et*

al, 1978; Zubrycki *et al*, 1990). Ensayos realizados en roedores en los que se compara la actividad locomotora inducida por estos análogos con la inducida por la cocaína han revelado que, a pesar de la tenue estimulación que pueden producir estos compuestos, en comparación con la administración de una sustancia inocua, el efecto es en todos los casos menor que el producido por la cocaína (Agoston *et al*, 1997; Desai *et al*, 2005b; Ferragud *et al*, 2009; Katz *et al*, 2001; Katz *et al*, 1999; Katz *et al*, 2004; Katz *et al*, 1997; Kline *et al*, 1997; Newman *et al*, 1994; Tolliver *et al*, 1999; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a).

Estudios detallados del patrón temporal de activación locomotora han mostrado que la cinética de estos compuestos es diferente a la exhibida por otras moléculas psicoestimulantes como la cocaína. Mientras que esta última ejerce su efecto de una manera rápida y transitoria, los análogos de la BZT actúan más lentamente y durante un tiempo más prolongado (Katz *et al*, 1999; Tolliver *et al*, 1999). Esta menor efectividad en cuanto a la inducción de efectos estimulantes por parte de los análogos no es debida a una reducción en la afinidad por el transportador de DA, ya que se ha demostrado que estas moléculas presentan una elevada y selectiva afinidad por la proteína, en comparación con la afinidad por el resto de transportadores de monoaminas (Katz *et al*, 1999). Estudios que relacionan la estructura de las moléculas con su actividad, han indicado que aquellos análogos con sustituciones de flúor en posición *para* en alguno de los anillos de benceno, muestran una mayor eficacia en la inducción de la actividad locomotora, que aquellas que presentan sustituciones con cloro, a pesar de tener afinidades similares por el DAT (Katz *et al*, 1999) (Tabla 4). Estudios de combinación han demostrado que administrados antes que la cocaína, los análogos pueden modificar la estimulación locomotora inducida por la droga. Por ejemplo, se ha observado en ratas que el pretratamiento con uno de los análogos, 4'-Cl-BZT, incrementa la estimulación locomotora inducida tras la administración de un *challenge* con una dosis baja de cocaína (Tolliver *et al*, 1999). Por el contrario, la administración de otros derivados de la BZT es capaz de atenuar el efecto inducido por la droga (Desai *et al*, 2005b; Katz *et al*, 2004). Experimentos presentados en

esta tesis doctoral apoyan y aportan nuevas evidencias a favor de estos resultados. Los experimentos realizados por Katz demostraron que el AHN 1-055, al igual que la cocaína, producía en ratones un incremento en la actividad locomotora de manera dependiente de la dosis, alcanzando un punto límite a partir del cual la actividad comienza a disminuir conforme se va incrementando la dosis, siendo ésta en todos los casos menor que la producida por la cocaína (Katz *et al*, 2004). En un estudio posterior realizado por Li *et. al.*, los investigadores concluyeron que la administración del análogo no producía incrementos significativos en la actividad locomotora, contrariamente a lo observado tras la administración de cocaína, aunque las dosis empleadas en este estudio fueron mucho menores que las empleadas en el anterior (Li *et al*, 2005). Experimentos realizados en nuestro laboratorio continuaron con esta línea experimental aportando nuevas evidencias, tal y como se describirá en los siguientes capítulos de esta tesis. Asimismo, estudios previos a los nuestros con otro de los análogos, JHW 007, mostraron que esta molécula era capaz de bloquear la actividad locomotora inducida tras una administración aguda de cocaína (Desai *et al*, 2005b). Nuestros experimentos, tal y como se describirán más adelante, extendieron estas observaciones.

En relación con los efectos de las drogas sobre la actividad locomotora, conviene hacer referencia a un fenómeno asociado denominado sensibilización locomotora. La sensibilización es un proceso caracterizado por un incremento de la actividad locomotora y efectos reforzantes, que aparece tras la administración repetida en muchas de las sustancias con potencial de abuso (Robinson and Becker, 1986; Robinson *et al*, 1993). Esta hipersensibilidad a los efectos estimulantes y reforzantes de las drogas esta mediada por acciones a nivel del NAc y de estructuras relacionadas (Koob and Bloom, 1988; Wise *et al*, 1987) y puede persistir durante meses, años o incluso permanentemente (Kalivas and Stewart, 1991; Paulson *et al*, 1991; Stewart and Badiani, 1993), probablemente debido a las modificaciones estructurales producidas en los circuitos neuronales y en especial a los cambios en la plasticidad sináptica (Pierce *et al*, 1997; Robinson *et al*, 1986; Stewart *et al*, 1993; Wolf, 1998).

Se ha demostrado ampliamente que las drogas psicoestimulantes producen un efecto de sensibilización comportamental que resulta en un incremento en la actividad locomotora como respuesta a la administración de un *challenge* (Li et al, 2000; Martin-Iverson and Burger, 1995; Paulson et al, 1991; Robinson and Camp, 1987). Una de las líneas experimentales seguidas, tal y como se detalla en la sección de resultados, fue intentar determinar si este efecto de sensibilización, característico de los psicoestimulantes clásicos, es una propiedad compartida por los análogos de la BZT.

3.2.2. Discriminación

La discriminación de drogas (DD) es un método útil para el estudio de los efectos comportamentales y neurofarmacológicos de las drogas. Los animales son entrenados a emitir una respuesta después de la administración de una inyección de droga y una respuesta diferente cuando reciben solución salina. Durante las sesiones de entrenamiento, las respuestas son reforzadas de manera alterna, por lo que el único estímulo que indica al sujeto cual de las dos respuestas es la correcta es la propia inyección, bien de droga o de vehículo (Holtzman, 1990). Normalmente la respuesta consiste en presionar una palanca determinada dependiendo de la sustancia administrada. Una vez la discriminación ha sido aprendida, el animal debe presionar la palanca apropiada de acuerdo a los efectos que está experimentando después de la administración del compuesto de interés. La discriminación de drogas es un método útil para determinar si los efectos de la sustancia que quiere testarse son percibidos como similares o diferentes a los de la droga utilizada en las sesiones de entrenamiento.

Los estimulantes como el alcohol, la cafeína, la anfetamina, la metanfetamina o la cocaína, han sido utilizados como estímulo discriminativo en muchos estudios de DD (Filip and Przegalinski, 1997; Gatch et al, 2003; Harland et al, 1989; Kleven and Koek, 1998; Mumford and Holtzman, 1991; Suzuki et al, 2004; Woolverton, 1991). Se ha demostrado que la capacidad de muchos de los inhibidores de la captura de monoaminas de sustituir de manera efectiva a la

cocaína, está relacionada con su específica afinidad por el DAT (Baker *et al*, 1993; Katz *et al*, 2000). Además, inhibidores de la captura con elevada afinidad por los transportadores de serotonina (SERT) o noradrenalina (NET), no sustituyen completamente a la cocaína (Baker *et al*, 1993; Kleven *et al*, 1998) (Tabla 4). Compuestos como el mazindol, la nomifensina, el GBR 12909 o el bupropión, que son principalmente inhibidores de la captura de DA, presentan diferentes niveles en su capacidad de sustituir a la cocaína y muchos de ellos no llegan a hacerlo completamente. Un estudio comparativo entre análogos de la BZT que presentan sustituciones con F, Cl, Br o metoxi, demostró que los análogos más eficientes son aquellos que tienen F por lo menos en uno de los anillos fenil de la molécula (Katz *et al*, 1999). Este incremento en la eficacia de los derivados con F como son el AHN 1-055, AHN 2-003, AHN 2-005 y JHW 005, da como resultado una respuesta más elevada en la palanca asociada a la cocaína, a pesar de que ninguno de ellos llega a sustituir completamente. En cambio, otros análogos como el JHW 007, GA 1-03 y JHW 025 no muestran los mismos efectos (Katz *et al*, 2004). Estudios de interacción en los que el JHW 007 fue administrado como pretratamiento antes de la cocaína, mostraron que la curva dosis-respuesta se desplazaba hacia la derecha, indicando que es necesaria una dosis mayor de análogo para alcanzar un nivel similar de respuestas en la palanca asociada a la cocaína, sugiriendo este resultado un antagonismo competitivo (Desai *et al*, 2005b).

3.2.3. Autoadministración

La autoadministración (SA) es un modelo animal de adicción a drogas que proporciona información sobre la eficacia reforzante de un compuesto. En general las drogas que son autoadministradas por los animales son aquellas que tienen un elevado potencial de abuso (Shippenberg and Koob, 2011). La SA es un procedimiento comportamental en el que la respuesta del sujeto, normalmente presionar una palanca, conlleva una infusión intravenosa de droga. Generalmente, la disponibilidad de la sustancia está señalizada mediante estímulos externos, como puede ser una luz o un sonido. Los animales son entrenados con una sustancia conocida, como puede ser cocaína, y testados con varias dosis del compuesto de

interés, al igual que con solución inocua. La frecuencia con la que el animal ejecuta la respuesta es indicativo de cuán reforzante es la sustancia que está siendo autoadministrada. La tasa de respuestas puede ser modificada por el experimentador incrementando el número de respuestas necesarias para conseguir una infusión o variando la dosis de droga infundida. Se asume que cuanto mayor es el número de respuestas emitidas para obtener el compuesto, más reforzante es éste (Katz, 1989) (Figura 6).

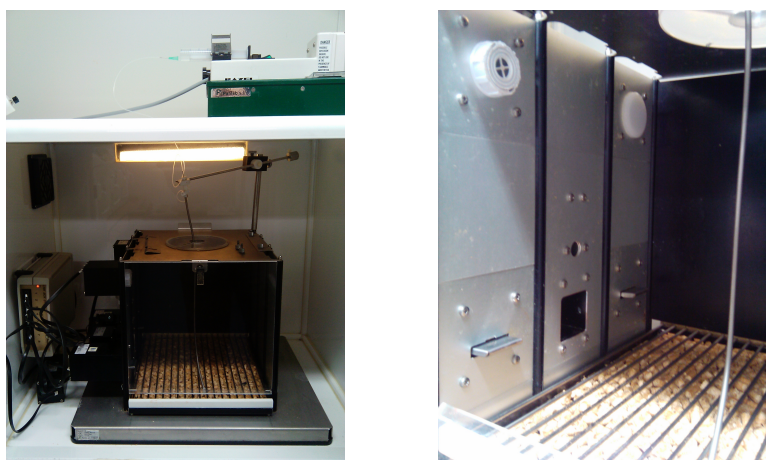


Figura 6.- Cámara operante para la autoadministración de drogas. Los animales conectados mediante un tubo a una bomba de infusión, reciben una dosis determinada de droga después de presionar voluntariamente una de las palancas. La bomba de infusión, palancas y luces, así como el programa de autoadministración, están conectados a un ordenador y controlados mediante un sistema informático (cámara operante utilizada en (Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b)).

Mientras que los efectos reforzantes de drogas psicoestimulantes como la cocaína, la anfetamina o el metilfenidato han sido ampliamente

documentados (Carney *et al*, 1991; Gonzalez and Goldberg, 1977; Herling *et al*, 1979; Johanson *et al*, 1976), el número de estudios en los que se ha evaluado la capacidad reforzante de los análogos es mucho menor. El primero de ellos fue diseñado para examinar y comparar en monos *Rhesus* el perfil de SA, la afinidad por el DAT y los efectos reforzantes de la BZT y dos de sus análogos, 3'-Cl-BZT y 4'-Cl-BZT. La tasa de respuestas fue mantenida con ambos análogos, pero no con la BZT, sugiriendo que posee un débil efecto reforzante, a pesar de su elevada afinidad por el DAT (Woolverton *et al*, 2000). El segundo de los estudios fue planteado para testar la hipótesis de que los análogos 3'-Cl-BZT y 4'-Cl-BZT mostraban débiles propiedades reforzantes, evaluando sus efectos al incrementar el requerimiento de la tarea y comparando éstos con los efectos de la cocaína y del GBR 12909. El efecto reforzante de los análogos fue evidente bajo un programa de razón fija (FR), pero este resultado varió a medida que la tarea requería un mayor trabajo. Bajo un programa de razón progresiva (PR), los análogos de la BZT carecían de propiedades reforzantes, mientras que la cocaína mostró ser la sustancia más reforzante seguida del GBR 12909 (Woolverton *et al*, 2001). El número de respuestas realizadas antes de que el sujeto para de responder (punto de corte o *break point*), es considerado como una medida de lo reforzante que es el compuesto (Hodos, 1961). Un estudio realizado recientemente analizó en ratas los efectos reforzantes de los análogos de la BZT, AHN 2-055 y JHW 007, bajo un programa de FR5, es decir, eran necesarias 5 respuestas para conseguir el refuerzo, y se compararon éstos con el efecto producido por inhibidores típicos del DAT. El metilfenidato, uno de estos inhibidores de la captura de DA, mantuvo la respuesta en niveles similares a los de la cocaína, mientras que el citalopram o la nisoxtetina, inhibidores del SERT o NET, no la mantuvieron. Bajo las mismas condiciones experimentales, ninguno de los dos análogos mantuvo tasas de respuesta por encima de las mantenidas con vehículo. El análogo AHN 1-055 mantuvo tasas moderadas de respuesta, aunque éstas fueron más bajas que las mantenidas con cocaína o metilfenidato (Hiranita *et al*, 2009). Un estudio realizado en nuestro laboratorio y publicado por las mismas fechas (Ferragud *et al*, 2009) en el que utilizamos ratas como sujetos experimentales, apoyó parte de estos resultados obtenidos con el AHN 1-055 por

Hiranita *et al.* Nosotros observamos que tanto la cocaína como el AHN 1-055 mostraron tasas similares de respuesta. Sin embargo, cuando el requerimiento de la tarea fue en aumento bajo un programa de PR, la respuesta de ambos grupos difirió significativamente. Las ratas que respondían por cocaína fueron regulando su respuesta para obtener dosis similares de droga, mientras que las ratas que se autoadministraban AHN 1-055 disminuyeron su tasa de respuesta progresivamente (conforme aumentaba el requerimiento de la tarea), llegando incluso a extinguir el comportamiento, sugiriendo que el análogo tiene un bajo efecto reforzante. Además, tras dos semanas en las que los animales no tuvieron la oportunidad de responder, la respuesta previamente obtenida con el AHN 1-055 se redujo a las tasas alcanzadas con vehículo, mientras que la tasa mantenida con cocaína se mantuvo (Ferragud *et al*, 2009). En otros trabajos realizados también en ratas, la administración de metilfenidato de forma oral antes de la sesión de SA, desplazó la curva de dosis-respuesta de cocaína hacia la izquierda, sugiriendo que este compuesto no antagoniza los efectos reforzantes de la cocaína, sino que ejerce un efecto aditivo sobre los mismos. Por el contrario, la administración oral de análogos de la BZT como el AHN 2-005 y el JHW 007, desplazó la curva hacia la derecha, lo que sugiere un efecto antagonista por parte de estos fármacos sobre los efectos reforzantes de la cocaína (Hiranita *et al*, 2009). Los efectos del análogo AHN 1-055 fueron más complejos. Dosis intermedias del fármaco incrementaron la tasa de respuesta a dosis bajas de cocaína, mientras que la disminuyeron conforme la dosis se incrementaba. Dosis más altas de AHN 1-055 desplazaron la curva dosis-respuesta de cocaína hacia la derecha, disminuyendo la conducta de SA y sugiriendo por tanto un efecto antagonista (Hiranita *et al*, 2009). Es importante mencionar que los cambios inducidos sobre la SA de cocaína tras el pretratamiento con AHN 2-005, JHW 007 y AHN 1-055, suprimieron específicamente el consumo de cocaína de manera dependiente de la dosis, sin afectar a la tasa de respuesta mantenida por comida o sacarosa (Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009).

3.2.4. Preferencia de lugar condicionada

La preferencia de lugar condicionada (CPP) continúa siendo uno de los modelos más utilizados para el estudio de los efectos motivacionales de diferentes compuestos. Básicamente en el paradigma de CPP, el efecto de un compuesto actúa como estímulo incondicionado que es asociado con un contexto y claves determinadas, que se comportan como estímulo condicionado. La mayor parte de los estudios publicados realizan el procedimiento en tres fases. La primera es el precondicionamiento en el que se testa el tiempo que el sujeto permanece en cada uno de los compartimentos de la caja, que deben ser claramente diferentes el uno del otro. La segunda fase, el condicionamiento, consiste en colocar al animal en uno de los dos compartimentos disponibles, sin posibilidad de acceder al otro. El animal es tratado con el compuesto de interés o con vehículo de manera contrabalanceada y depositado en uno u otro compartimento dependiendo de la sustancia recibida. De esta manera el animal aprende a asociar de una manera involuntaria los efectos, bien recompensantes o aversivos, de la sustancia administrada con un determinado contexto. En la última fase, denominada test o postcondicionamiento, se permite de nuevo el acceso del animal a los compartimentos y se compara cuánto tiempo permanece en el asociado a la droga con el asociado al vehículo (Figura 7).

En este tipo de estudios el tiempo transcurrido desde la administración de la sustancia y la colocación del animal en el compartimento es un factor manipulable importante a tener en cuenta que puede proporcionar resultados variables. De esta manera, el estudio de los efectos de una droga a diferentes tiempos bajo este paradigma de CPP, puede proporcionar información sobre el rango de tiempo en el que el fármaco está siendo efectivo (Cunningham *et al*, 2002; Fudala and Iwamoto, 1990). El intervalo de tiempo, de 0 a 90 minutos de espera entre la administración de los análogos de la BZT y la sesión de condicionamiento, fue investigado por Li, Newman y Katz (2005). Los efectos producidos por la cocaína fueron robustos y reprodujeron resultados obtenidos previamente (Tzschentke, 1998), mientras que los análogos AHN 2-005, AHN 1-

055 y JHW 007 fueron menos efectivos y sólo en algunas circunstancias incrementaron el tiempo pasado en el compartimento asociado al compuesto. Por ejemplo, el AHN 2-005 sólo produjo un efecto significativo cuando fue administrado a la dosis de 3 mg/kg y 45 minutos antes de la sesión de concionamiento. A todas las demás dosis del rango comprendido entre 0.1 mg/kg-10 mg/kg (exceptuando la dosis de 3 mg/kg) y tiempos, el fármaco no produjo ningún efecto. La administración de 10 mg/kg de JHW 007, 45 minutos antes del condicionamiento incrementó el tiempo pasado en el compartimento asociado, pero no cuando el animal fue colocado inmediatamente o transcurridos 90 minutos ni tampoco a ninguna otra dosis estudiada. El AHN 1-055 no mostró ningún efecto significativo dentro del intervalo de dosis y tiempo estudiados (Li *et al*, 2005).

Basándonos en este trabajo previo, nuestro laboratorio inició una serie de estudios empleando el modelo de CPP como modelo animal de adicción a psicoestimulantes, dando como fruto una gran parte de los resultados presentados en esta tesis doctoral, que apoyaron y ampliaron los resultados publicados por Li *et al*.

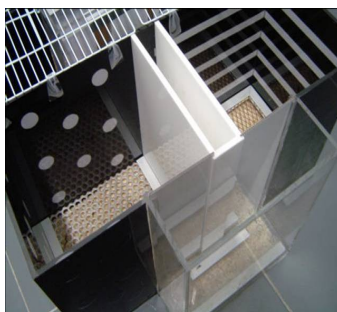


Figura 7.- Aparato utilizado para los ensayos de preferencia de lugar condicionada. Los dos compartimentos en los que los animales reciben la solución inócua o bien la droga, se diferencian tanto en el patrón de dibujo de las paredes como en el del suelo. Las guillotinas bloquean el paso de uno a otro durante las sesiones de condicionamiento (aparato de CPP utilizado en (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b)).

3.3. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

La mayor parte de los efectos comportamentales de la cocaína se han relacionado con su capacidad de bloquear el DAT, acción que conduce a un incremento en la neurotransmisión de DA. Los efectos de la cocaína sobre los niveles extracelulares de DA en las terminales dopaminérgicas de diferentes regiones cerebrales han sido ampliamente estudiados usando técnicas de microdiálisis (Kuczenski and Segal, 1992; Pontieri *et al*, 1995; Tanda *et al*, 1997) y voltametría (Greco and Garris, 2003).

Los efectos de uno de los análogos, 4'-Cl-BZT, en la estimulación de los niveles de DA fueron comparados con los de la cocaína en diferentes estudios de microdiálisis realizados en ratas. Un estudio fue realizado con sondas implantadas en el NAc (Tolliver *et al*, 1999) y otro con sondas implantadas en terminales dopaminérgicas de áreas específicas, que incluían el *shell* y *core* del NAc, la CP y el estriado dorsal (Tanda *et al*, 2005). Los resultados de estos estudios revelaron que tanto la cocaína como el 4'-Cl-BZT estimularon, de manera dependiente de la dosis, el nivel de DA en todas las regiones analizadas, aunque éste fue el doble o triple de potente en el caso de la cocaína (Tanda *et al*, 2005). La región donde las diferencias entre las dos sustancias fueron más evidentes fue en el *shell* del NAc, siendo la cocaína superior en potencia y efectividad. En cambio, en la CP se observó un patrón diferente donde en este caso el análogo fue mas efectivo que la droga. El incremento en el nivel de DA inducido por cocaína fue rápido, transitorio y superior al del análogo, a pesar de que el efecto inducido por éste fue más duradero llegando, la dosis más alta testada, a mantenerse estable hasta 5 horas después de haber sido administrada. Parece ser que estos efectos prolongados en el tiempo pueden ser debidos a una tasa más lenta de eliminación de estos compuestos. Un estudio reciente realizado en ratones con JHW 007 mostró también que este análogo incrementaba de manera dependiente de la dosis, aunque con menor potencia, los niveles extracelulares de DA en comparación con la cocaína, siendo la duración de los efectos superior a las 24 horas (Tanda *et al*, 2005). El efecto antagonista del JHW 007, reflejado en diferentes estudios comportamentales,

como la estimulación locomotora o la autoadministración, sugieren que la interacción entre el análogo y la droga, puede conllevar algún tipo de alteración en el incremento de los niveles de DA inducidos por la cocaína. Partiendo de esta idea, el efecto de la combinación de diferentes dosis de JHW 007 y cocaína sobre la estimulación de los niveles de DA en el *shell* del NAc fue examinada en ratones y comparada con el efecto que producía la combinación de cocaína con otro inhibidor del DAT como el WIN 35,428. Los resultados mostraron que la combinación cocaína-WIN 35,428 producía un incremento en los niveles extracelulares de DA que eran superiores a los producidos debido a un simple efecto aditivo. Por el contrario, los efectos de la combinación cocaína-JHW 007 fueron consistentemente menores que los predichos, efecto que apoyó los resultados comportamentales previamente publicados (Desai *et al*, 2005b; Hiranita *et al*, 2009) y planteó la hipótesis de que el análogo puede reducir la efectividad de la cocaína en su capacidad de incrementar el nivel de DA en regiones cerebrales relacionadas con sus propiedades reforzantes.

Como se ha mencionado anteriormente, una de las hipótesis actuales para explicar la menor efectividad de los análogos en su capacidad de producir acumulación de DA y una mayor duración de los efectos, en comparación con la cocaína, podría ser su lenta eliminación. Los parámetros farmacocinéticos de alguno de estos compuestos han sido estudiados y comparados con los obtenidos con la cocaína (Othman *et al*, 2007a; Othman *et al*, 2007b; Raje *et al*, 2003; Raje *et al*, 2006). En estos estudios, realizados en ratas, los análogos de la BZT fueron administrados por vía intravenosa para eliminar las posibles diferencias en las tasas de absorción desde el lugar de inyección. La diferencia más notable fue la lenta eliminación del plasma y cerebro de los análogos, en comparación con la cocaína. Esta tasa de eliminación más lenta podría ser una explicación al hecho de que los niveles extracelulares de DA se mantengan elevados durante más tiempo. Por otra parte, todos los análogos estudiados se han encontrado en altas concentraciones en el cerebro tras pocos minutos después de su administración, en cantidades que varían entre los 4-15 µg/g de tejido (Othman *et al*, 2007a; Othman

et al, 2007b; Raje *et al*, 2003; Raje *et al*, 2006), efecto que parece contrastar con el inicio de acción más lento de estas sustancias a nivel neuroquímico y comportamental.

3.4. EFECTOS *IN VIVO* VS. EFECTOS *IN VITRO*.

Varios estudios han indicado que la ocupación del DAT por parte de la cocaína u otros inhibidores de la captura de DA corresponde, generalmente, con sus efectos comportamentales. Por ejemplo, se ha confirmado que dentro del espectro de los análogos del feniltropano, la potencia con la que pueden estimular la actividad locomotora está íntimamente ligada a la potencia con la que pueden desplazar el WIN 35,428 [H]³ de los sitios de unión al transportador (Cline *et al*, 1992). Los resultados obtenidos por Cline *et al*. son similares a los obtenidos por otros investigadores como Bergman, Ritz o Kuhar, los cuales aportaron datos que revelaban que la potencia de los efectos reforzantes de varios inhibidores del DAT estaban relacionados con la afinidad con la que se unían al transportador (Bergman *et al*, 1989; Kuhar *et al*, 1991; Ritz *et al*, 1987). Sin embargo, otros estudios han sugerido una mayor complejidad en la relación entre las acciones que compuestos inhibidores de la captura ejercen sobre el transportador y sobre el comportamiento. Por ejemplo, Rothman *et al*. mostraron en ratas que varios inhibidores del DAT, entre ellos la cocaína y el GBR 12909, inducían niveles comparables de estimulación locomotora a pesar de que la potencia con la que desplazaban el [125I]RTI-121 era del 60% y 100% respectivamente (Rothman *et al*, 1992). Un estudio posterior reveló que la cocaína desplazaba el [125I]RTI-121 de forma dependiente de la dosis y del tiempo, llegando al máximo desplazamiento 30 minutos después de la inyección. Los análogos de la BZT desplazaron el [125I]RTI-121 de la misma manera, aunque tanto el AHN 2-005 como el AHN 1-055 alcanzaron el máximo desplazamiento a los 150 minutos tras la inyección y el JHW 007 tras un periodo de 4.5 horas. Los resultados del desplazamiento obtenidos por los análogos, que fueron superiores en todos los casos a los obtenidos con la

cocaína, son consistentes con los resultados que indican que estos compuestos poseen una lenta tasa de eliminación, obtenidos en estudios farmacocinéticos. La relación entre la ocupación del DAT y los efectos en el comportamiento fue medida mediante el estudio de la relación existente entre el desplazamiento de [125I]RTI-121 y la actividad locomotora (Desai *et al*, 2005a; Desai *et al*, 2005b). Los resultados mostraron una correlación significativa entre la ocupación del transportador y el efecto locomotor, a varias dosis y varios de los tiempos analizados. Sin embargo, ésta no fue tan fuerte como se esperaba. Un efecto interesante de dicho estudio fue el desproporcionado efecto locomotor inducido pocos minutos después de la administración de cocaína, que no correlacionaba con las tasas de ocupación en el DAT previstas. Debido a que esta divergencia en la regresión fue observada en datos obtenidos a tiempos muy cortos tras la inyección, estos datos parecen sugerir que la tasa de ocupación juega un papel clave en los efectos estimulantes de la cocaína, tanto en animales como en humanos (Desai *et al*, 2005a; Volkow *et al*, 2002).

3.5. ESTUDIOS MOLECULARES

Diferentes estudios han sugerido que la BZT y algunos de sus análogos se unen al DAT de manera diferente a como lo hace la cocaína. Estas diferencias en el modo de interacción de ambos tipos de compuestos puede estar relacionada con los diferentes efectos que inducen (Desai *et al*, 2005a; Volkow *et al*, 2002). Varios autores han llevado a cabo estudios que demuestran que la BZT o sus análogos presentan diferencias en la forma de unirse al transportador de DA mutado o sin modificar (Chen *et al*, 2004). Por ejemplo, la mutación obtenida tras el intercambio de una molécula de aspartato por una de glutamato en la posición 79 del DAT, incrementa la potencia de la BZT y sus análogos como inhibidores de la captura de DA, mientras que la cocaína y otros inhibidores típicos del DAT no se ven afectados (Ukairo *et al*, 2005).

Estudios con técnicas moleculares, como la mutagénesis de sitio dirigido, continuaron apoyando esta hipótesis (Reith *et al*, 2001). Este estudio comparó como la cocaína y la BZT influían en la reacción del [2-(trimetilamonio)etil]metanotiosulfonato (MTSET) sobre varios residuos de cisteína localizados en diferentes regiones del DAT de origen humano. Un estudio previo había mostrado que la afinidad del análogo de la cocaína, WIN 35,428 por el DAT, era aumentada por la reacción que el MTSET producía sobre un residuo de cisteína localizado en un bucle extracelular en la posición 90 del transportador. La cocaína incrementaba la potencia de esta reacción, de manera que potenciaba la afinidad del WIN 35,428 por el DAT. Por otra parte, cuando la reacción se producía sobre otros residuos de cisteína localizados en bucles citoplasmáticos, la cocaína disminuía la reacción. El estudio llevado a cabo por Reith *et al*. mostró que la BZT no tenía ningún efecto sobre ninguna de las reacciones, independientemente del residuo de cisteína. Este resultado sugirió la idea de que la BZT e inhibidores típicos de la captura de DA producían cambios conformacionales diferentes en el DAT.

Un trabajo posterior propuso que el aminoácido tirosina de la posición 335 del DAT era crítico para la regulación del equilibrio entre los dos tipos de conformaciones bajo las que puede encontrarse la proteína (Loland *et al*, 2002). El cambio de este aminoácido por alanina dificulta el transporte de DA y disminuye la potencia de la cocaína y sus análogos como inhibidores de la captura de DA, hasta el punto de ser aproximadamente unas 100 veces menos potentes cuando el DAT presenta la mutación. Los derivados de la BZT, en cambio, sólo mostraron una disminución entre 7-58 veces menor, a excepción del MFZ 2-71, cuya potencia se vio disminuída unas 88 veces, valor que se aproximó al obtenido con la cocaína y fue similar al obtenido con uno de sus análogos, el RTI-55. Los estudios comportamentales confirmaron que el MFZ 2-71 se comportaba de manera diferente al resto de compuestos análogos de la BZT, al demostrar que no sólo producía un evidente incremento en la actividad locomotora si no que también sustituyó completamente en sujetos entrenados a discriminar entre inyecciones de

cocaína y vehículo. Para todos los demás compuestos, se estableció una correlación entre la disminución en la potencia como inhibidores de la captura, debido a la mutación en el transportador, y su efectividad en estimular la locomoción y sustituir por cocaína en experimentos de discriminación (Loland *et al*, 2008). Este mismo estudio comparó los efectos de inhibidores del DAT en la accesibilidad del MTSET a un residuo de cisteína insertado en el DAT humano expresado en células COS7. Se cree que esta cisteína es inaccesible cuando el DAT se encuentra en conformación cerrada, pero accesible cuando la conformación es abierta. Los efectos sobre la inhibición del DAT inducidos sólo por el MTSET son potenciados por la cocaína, lo que sugiere que la droga estabiliza el transportador bajo la configuración abierta. Por el contrario, los análogos de la BZT ejercen el efecto contrario estabilizando la molécula bajo la conformación cerrada en la que el MTSET tiene acceso limitado.

Estudios moleculares recientes basados en la estructura del transportador homólogo LeuT bacteriano, han modelado cómo la cocaína y sus análogos se unen al DAT. El modelo ha sugerido que el sitio de unión de la cocaína y sus derivados en el transportador se encuentra en un bolsillo entre los segmentos transmembrana 1, 3, 6 y 8 y solapa con el lugar de unión de los sustratos DA y anfetamina (Beuming *et al*, 2008; Indarte *et al*, 2008), así como con el de inhibidores de la captura de DA derivados de la BZT (Beuming *et al*, 2008; Bisgaard *et al*, 2011).

Todos estos estudios han aportado evidencias que sugieren que las diferencias observadas entre los análogos de la BZT y la cocaína en la manera de interaccionar y unirse al transportador de DA, podrían explicar las diferencias farmacológicas, comportamentales y neuroquímicas descritas en los apartados anteriores.

3.6. ACCIÓN SOBRE OTRAS DIANAS

Como se ha comentado anteriormente, la molécula original de BZT presenta propiedades anticolinérgicas y antihistamínicas (McKearney, 1982; Richelson, 1981). Estudios de afinidad llevados a cabo con los derivados de la BZT han mostrado que la mayoría son inhibidores selectivos del DAT. Sin embargo, algunos también presentan afinidad por los receptores M1 y H1 (Katz *et al*, 2001; Katz *et al*, 2004; Katz *et al*, 2003; McKearney, 1982; Richelson, 1981) (Tabla 4). Este hecho puede contribuir, en parte, a los diferentes efectos comportamentales existentes entre los análogos de la BZT y la cocaína. Varios estudios fueron iniciados para estudiar con más profundidad las afinidades de los análogos sobre otras moléculas. La hipótesis propuesta fue que si la unión de los derivados sobre otras dianas, no mediadas por el DAT, atenuaban los efectos estimulantes, los efectos inducidos por psicoestimulantes como la cocaína o anfetamina, podrían ser antagonizados, al menos parcialmente, por alguno de estos compuestos.

3.6.1. Actividad antagonista sobre receptores histamínicos

Como se ha comentado previamente, si los efectos histamínicos antagonistas de los análogos de la BZT interfieren en la expresión de los efectos estimulantes, el uso de estos agentes debería atenuar los efectos inducidos por la cocaína (Campbell *et al*, 2005). Ratas entrenadas a discriminar entre inyecciones de cocaína y vehículo, fueron testados con diferentes dosis de cocaína, tanto sola como administrada después de un pretratamiento con diferentes antagonistas de receptores histamínicos H1. Los resultados de este estudio fueron variables. Mientras que la prometazina y tripolidina no modificaron los efectos subjetivos de la cocaína a ninguna de las dosis testadas, la clorofeniramina y mepiramina potenciaron este efecto desplazando la curva dosis-efecto de la cocaína hacia la izquierda (Bergman and Spealman, 1986; Tuomisto and Tuomisto, 1980). El efecto de estos dos últimos compuestos podría deberse a que ejercen también una acción inhibidora sobre el DAT (Bergman *et al*, 1986; Campbell *et al*, 2005; Tuomisto *et al*, 1980). El estudio de Campbell *et al*. demostró que la afinidad por los receptores

H₁, en relación a la afinidad por los receptores DAT, no predecía el resultado de los efectos comportamentales.

Estos resultados no parecen indicar que las acciones antagonistas o agonistas de sustancias histamínicas puedan modificar sustancialmente ni los estímulos discriminativos ni los efectos locomotores de la cocaína. Además, en otros estudios se ha indicado que algunos antagonistas H₁, al tener acciones mediadas por el DAT, pueden tener propiedades reforzantes (Bergman, 1990; Bergman *et al*, 1989; Wang and Woolverton, 2007, 2009). En estudios de microdiálisis, la administración intravenosa de difenhidramina y enantiómeros de la clorofeniramina, elevó de manera dependiente de la dosis y de manera selectiva, los niveles de DA en el *shell* del NAc comparado con el *core* (Tanda *et al*, 2008). Sin embargo, un antagonista selectivo de los receptores H₁, la triprolidina, no modificó los niveles extracelulares de DA. Estos resultados parecen indicar que las acciones antagonistas sobre los receptores de histamina no previenen de los efectos inducidos por los psicoestimulantes. Por ello no parece que esta sea la causa que explica el por qué los análogos de la BZT, que tienen efectos antihistamínicos, exhiben un perfil comportamental diferente al mostrado por los psicoestimulantes en modelos animales de adicción.

3.6.2. Actividad antagonista sobre receptores muscarínicos M₁

Al igual que con los efectos histamínicos, si las acciones muscarínicas de los derivados de la BZT interfirieran con los efectos de la cocaína, un antagonista de estos receptores podría atenuar los efectos evocados por los estimulantes. En lugar de eso, anticolinérgicos no selectivos como la atropina o escopolamina, potenciaron varios de los efectos comportamentales (Carlton and Didamo, 1961; Scheckel and Boff, 1964), tanto en el paradigma de DD como en el de actividad locomotora (Katz *et al*, 1999). Estos resultados parecen indicar que el antagonismo muscarínico producido por alguno de los análogos de la BZT, no sería el causante de la atenuación de los efectos comportamentales de la cocaína.

Los análogos de la BZT muestran preferentemente afinidad por los receptores muscarínicos M1 (Tanda *et al*, 2007), en comparación con los receptores M2-M5, mientras que la atropina y escopolamina no poseen una afinidad específica (Buckley *et al*, 1989). El trabajo de Tanda *et al*. investigó los efectos de los antagonistas selectivos M1, telencepina y trihexifenidilo en combinación con cocaína. Mientras que este último potenciaba los efectos de la droga incrementando la estimulación locomotora, la telencepina los atenuó. Ambas sustancias potenciaron de manera selectiva y dependiente de la dosis los efectos de la cocaína sobre la inducción de DA, incrementando los niveles de neurotransmisor en el *shell* del NAc y CP. Ninguna de las dos sustancias atenuaron un amplio espectro de efectos inducidos por la cocaína, sugiriendo que la afinidad de los análogos de la BZT y sus acciones sobre los receptores M1 no son la causa de sus reducidos efectos estimulantes y reforzantes, ni de su habilidad para reducir los efectos de la cocaína (Tanda *et al*, 2007).

Para estudiar con más profundidad esta hipótesis, se sintetizaron y testaron una generación de análogos de la BZT que presentaba una afinidad baja por receptores M1, pero mantenían su afinidad y selectividad por el DAT (Agoston *et al*, 1997; Katz *et al*, 2004; Kulkarni *et al*, 2004; Robarge *et al*, 2000; Zou *et al*, 2003). Entre todas las moléculas testadas, el AHN 1-055 resultó ser el compuesto que presentó la mayor afinidad tanto por el DAT como por los receptores M1, 11.8 y 11.6 nM respectivamente, así como el análogo que incrementó con mayor efectividad la actividad locomotora acercándose, bajo determinadas condiciones experimentales, a niveles comparables a los de la cocaína. Por el contrario, análogos como el AHN 2-055 y JHW 007, con afinidades mucho menores tanto para el DAT como para el M1, mostraron una menor eficacia tanto como estimulantes como sustituyentes en ratas entrenadas a discriminar entre inyecciones de cocaína y vehículo (Katz *et al*, 2004).

Varios estudios han investigado más directamente si la actividad antagonista sobre los receptores muscarínicos contribuye de alguna manera a los efectos reforzantes de la cocaína o puede explicar las diferencias observadas entre

los análogos de la BZT y la cocaína. En uno de estos estudios, monos *Rhesus* fueron entrenados a autoadministrarse cocaína bajo programas FR o de PR. En la mayoría de los casos, la combinación de cocaína y escopolamina mantuvo tasas de respuesta menores que las mantenidas exclusivamente por la cocaína. Los autores concluyeron que la menor tasa de SA de los análogos de la BZT en relación a la cocaína, podía ser debida a sus acciones anticolinérgicas, sugiriendo que el mecanismo podía deberse tanto a un antagonismo de los efectos reforzantes de la cocaína como a un posible efecto aversivo asociado a la actividad anticolinérgica (Ranaldi and Woolverton, 2002). Previamente a este trabajo, Wilson y Schuster (1973) mostraron que la atropina incrementaba, en lugar de disminuir, las tasas de respuesta mantenidas por la cocaína, resultado que no es consistente con la idea de que los agentes anticolinérgicos ejerzan algún tipo de efecto aversivo que implique la inhibición de la conducta. Además, el incremento en el número de respuestas inducido por la atropina fue similar al obtenido disminuyendo la dosis de cocaína. En este paradigma, la atropina era administrada de forma no contingente a la respuesta del animal, antes de las sesiones de SA, de manera que no funcionaba como un estímulo negativo. Todas estas evidencias sugirieron que la potenciación de los efectos reforzantes de la cocaína por los agentes anticolinérgicos, implicaban un antagonismo farmacológico no competitivo (Wilson and Schuster, 1973). Con posterioridad al trabajo de Ranaldi *et al.*, un estudio evaluó los efectos de la atropina utilizando el CPP como paradigma experimental. La administración de atropina produjo una tendencia a la aversión de lugar condicionada y combinada junto con cocaína provocó una disminución de la efectividad de la droga en su capacidad de inducir CPP (Li *et al*, 2005). En contra de la hipótesis anterior propuesta por Wilson y Schuster, los resultados obtenidos del trabajo de Li *et al.*, indicaban una base comportamental, en lugar de farmacológica, para la interacción de los anticolinérgicos con los efectos reforzantes de la cocaína, y además un efecto negativo de estos agentes. Debido a las inconsistencias entre ambos trabajos, no es posible establecer conclusiones definitivas que intenten explicar las bases de la interacción de los anticolinérgicos con la cocaína con los resultados actualmente disponibles.

La hipótesis de que los análogos de la BZT ejercen algún tipo de efecto negativo debido a su acción antimuscarínica se limitaría específicamente a procedimientos de SA. Como se ha comentado anteriormente, hay un amplio rango de diferencias comportamentales entre los análogos y otros inhibidores típicos de la captura de DA similares a la cocaína, como se ha mostrado en estudios de DD, actividad locomotora (Katz *et al*, 1999) y expresión de proteínas (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b). Sin embargo la mayoría de los resultados sugieren que los efectos antimuscarínicos potencian en lugar de antagonizar, muchos de los efectos de compuestos estimulantes similares a la cocaína. Si las acciones antimuscarínicas de algunos de estos análogos de la BZT aumentan o atenúan algunos de estos efectos de la cocaína puede depender de varios factores incluyendo el espectro comportamental analizado y dosis utilizadas (Newman *et al*, 2009; Tanda *et al*, 2009b).

3.6.3. Implicación de otros receptores

Mientras que la afinidad de la cocaína es equipotente para los transportadores de DA y 5-HT y menor para la NE, muchos de los análogos presentan un alto grado de afinidad selectivo para el DAT en comparación con los otros transportadores (Katz *et al*, 1999; Katz *et al*, 2004) (Tabla 4). En base a los resultados obtenidos con los análogos, tanto a nivel comportamental como neuroquímico, podría pensarse que agentes con baja afinidad por otros transportadores de monoaminas serían menos efectivos que la cocaína en la inducción de los efectos relacionados con la droga. Sin embargo, muchos estudios han indicado que el hecho de que un compuesto sea autoadministrado está relacionado con su afinidad por el DAT y no con la del NET o SERT (Bergman *et al*, 1989; Ritz *et al*, 1987). Además de esto, compuestos selectivos por el DAT exhiben algunos de los efectos reforzantes típicos de los psicoestimulantes (Howell *et al*, 2000; Roberts *et al*, 1999), mientras que inhibidores selectivos del SERT o NET no muestran el perfil de un estimulante clásico (Hiranita *et al*, 2009; Howell and Byrd, 1995; Woolverton, 1987).

Otra diana que puede estar implicada en la ausencia de los efectos comportamentales característicos de los psicoestimulantes mostrados por los derivados de la BZT, es el receptor sigma. Se ha observado que antagonistas de este receptor modulan algunos de los efectos inducidos por la cocaína, como son la estimulación locomotora y la recompensa en el modelo de CPP (Matsumoto *et al*, 2003), aunque no reducen la SA de cocaína (Martin-Fardon *et al*, 2007).

Los receptores cannabinoides CB₁, han sido implicados en las bases neurobiológicas de la adicción a psicoestimulantes (Arnold, 2005; Tanda *et al*, 2007), y se ha sugerido que moduladores alostéricos positivos de estos receptores CB₁ pueden mediar en alguno de los efectos antagonistas producidos por inhibidores atípicos del DAT (Navarro *et al*, 2009). El RTI-371, un análogo de la cocaína que se une al DAT y bloquea la actividad locomotora inducida por la droga, es una de las moléculas que se comportan como moduladores alostéricos positivos de los receptores CB₁. Esta molécula, junto con otros inhibidores selectivos del DAT, entre los que se encuentran análogos de la BZT como el JHW 007, además de exhibir efectos atípicos sobre la actividad locomotora, incrementan la eficacia de agonistas CB₁ como el CP 55940 en ensayos de metabolización del calcio. A partir de este estudio, Navarro *et al.*, sugirieron que un aumento en la transmisión del sistema cannabinoide podría contribuir a los efectos antagonistas de la cocaína observados con estos inhibidores atípicos de la captura de DA. Consistente con esta hipótesis hay evidencias que indican que agonistas cannabinoides, incluyendo cannabinoides endógenos, reducen la actividad locomotora espontánea a través de sus acciones sobre los receptores cannabinoides CB₁ (Ameri, 1999). Una posible hipótesis que puede explicar los resultados de los trabajos anteriores es que la activación de los receptores D₂, debido al incremento en el nivel de DA producido por estos inhibidores atípicos, podría incrementar los niveles de cannabinoides endógenos (Giuffrida *et al*, 1999), que junto con la modulación alostérica positiva que estos inhibidores ejercen sobre los receptores CB₁, potenciaría la transmisión del sistema que contrarestaría los efectos sobre la estimulación locomotora.

3.7. CONCLUSIÓN

La molécula de BZT es el único compuesto de la familia que ha sido aprobado para su uso en humanos debido a su efectividad en el tratamiento de los estados iniciales de la enfermedad de Parkinson. Sin embargo, hay sólo un trabajo en el cual la BZT ha sido evaluada para estudiar su posible potencial en el tratamiento de la adicción a la cocaína (Penetar *et al*, 2006). En este ensayo clínico, 16 sujetos consumidores recreacionales de cocaína, recibieron 3 dosis de BZT (1, 2 o 4 mg) o placebo dos horas antes de tener acceso libre a autoadministrarse cocaína por vía nasal (0.9 mg/kg). Durante estas dos horas se midieron distintas variables, tanto fisiológicas como subjetivas. La BZT administrada sola, no afectó los parámetros cardiovasculares o subjetivos de los pacientes. En cambio, la cocaína produjo incrementos en varias respuestas subjetivas siendo las más notables un estado de *high*, estimulación e incremento de la frecuencia cardíaca. Ninguno de estos efectos inducidos por la cocaína fueron modificados cuando la BZT se administró como pretratamiento. La ausencia de efectos subjetivos y fisiológicos adversos por parte de la BZT, sugirió la idea de que dosis más elevadas del fármaco podrían ser testadas en humanos para evaluar, en mejor medida, su potencial terapéutico como medicación en el tratamiento de la adicción a psicoestimulantes.

Sin embargo, los análogos de la BZT estructuralmente similares a la cocaína parecen tener una mayor prioridad en ser investigados y caracterizados como una posible medicación en desarrollo. Muchos de estos análogos a pesar de mostrar, al igual que la cocaína, una capacidad en el bloqueo de la captura de DA muestran, como se ha comentado reiteradamente a lo largo del capítulo, un perfil comportamental diferente. A pesar de estas características favorables obtenidas a partir de modelos animales de adicción a psicoestimulantes, estos análogos no han sido todavía testados en ensayos clínicos con humanos. Si una farmacoterapia efectiva para el tratamiento del abuso de estimulantes, requiriera efectos sobre la captura de DA y una mínima actividad sustitutiva agonista, estos compuestos ciertamente merecerían ser estudiados más ampliamente, ya que poseen ambas características.

Hipótesis y objetivos

Está ampliamente demostrado que el DAT es la principal diana para muchas drogas estimulantes, incluyendo la cocaína, anfetamina y metanfetamina. A pesar de que otros transportadores de monoaminas se encuentran también inhibidos por estos psicoestimulantes, los efectos reforzantes y neurotóxicos asociados están claramente mediados por el DAT. Partiendo de trabajos previos en los que se demostró que los análogos de la BZT eran moléculas con una alta afinidad por el DAT y que exhibían una pauta lenta y duradera de acción farmacológica, nos planteamos la hipótesis de que podrían ser herramientas eficaces para el tratamiento de la adicción a estimulantes. Dado que el modo de acción de la cocaína, anfetamina y metanfetamina es similar, predecimos que estas moléculas podrían mitigar los efectos de los psicoestimulantes en distintos modelos de adicción. Apoyando nuestra hipótesis, investigaciones recientes han demostrado que la unión al DAT y la consecuente inhibición del transporte de DA, no siempre correlaciona con efectos estimulantes. Esto ha sugerido que es posible el diseño de moléculas con potencial terapéutico para el tratamiento de la adicción a los estimulantes, incluso aunque éstas impidan el transporte de DA.

El objetivo general de la presente tesis doctoral es la caracterización de los posibles efectos terapéuticos de dos de los análogos derivados de la BZT, concretamente el AHN 1-055 y JHW 007, en modelos animales de adicción a psicoestimulantes. Para ello utilizamos diferentes paradigmas comportamentales de adicción (actividad locomotora, CPP, sensibilización y SA) y ensayos inmuncitoquímicos, con el fin de estudiar el efecto que tienen las propias moléculas y el grado en el que pueden modificar o prevenir algunos de los efectos producidos tras la administración de estimulantes como la cocaína o anfetamina.

Para alcanzar este objetivo principal, planteamos una serie de objetivos específicos:

1. Ensayos de actividad locomotora: Determinar si los análogos por sí solos inducen algún tipo de efecto psicomotor y la manera en la que pueden modificar el efecto inducido por la cocaína o anfetamina.

2. Ensayos de preferencia de lugar condicionada: Determinar si los análogos poseen algún tipo de efecto recompensante por sí mismos y estudiar el grado en el que, al ser administrados como pretratamiento, pueden modificar este mismo efecto inducido por las drogas.
3. Ensayos de sensibilización: Determinar si la administración repetida de los análogos produce un incremento gradual de la actividad locomotora, y si su administración como pretratamiento puede bloquear la sensibilización inducida por los estimulantes así como las neuroadaptaciones asociadas a este fenómeno.
4. Ensayos de autoadministración: Determinar si la administración de análogos de la BZT puede modificar la autoadministración de psicoestimulantes en ratas con un historial estable de consumo.

Estos objetivos fueron alcanzados mediante el planteamiento de diferentes experimentos que aportaron una serie de resultados que han sido publicados en diferentes revistas científicas. Para facilitar la comprensión, en la siguiente sección aparecen diferentes apartados que resumen los resultados obtenidos en cada artículo. Dichos artículos se han adjuntado en el anexo de esta tesis.

Resultados

1.- EL INHIBIDOR DE LA CAPTURA DE DOPAMINA 3 α -[BIS(4'-FLUOROFENIL)METOXI]-TROPANO REDUCE LA EXPRESIÓN DE GENES DE ACTIVACIÓN TEMPRANA, LA ACTIVIDAD LOCOMOTORA Y LA RECOMPENSA INDUCIDA POR LA COCAÍNA.

Ya que hasta la fecha los ensayos de actividad locomotora realizados se habían centrado en el estudio del efecto inducido únicamente por el AHN 1-055, uno de los primeros trabajos que nos planteamos fue examinar el efecto locomotor del análogo administrado tanto solo como combinado con cocaína y correlacionar los posibles cambios producidos con alguna variable neurobiológica. Para ello los animales recibieron diferentes dosis del análogo (0, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) y la actividad locomotora fue monitorizada durante 2 horas mediante un sistema de video seguimiento (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France). El análisis de los resultados reveló un efecto leve de inhibición de la locomoción por parte de la dosis más baja de AHN 1-055 y un efecto estimulante alcanzado con la dosis más alta. Para comparar el efecto inducido por el análogo con el efecto producido por la cocaína, un grupo diferente de animales recibió una dosis de droga (15 mg/kg i.p.) y la actividad locomotora se midió durante 1 hora. El resultado mostró que la cocaína incrementó de manera significativa la locomoción en relación al grupo control (Anexo artículo 1 figura 1a, 1b).

Paralelamente estudiamos la expresión estriatal de la proteína c-Fos inducida tanto por la exposición al análogo como a la cocaína. Los resultados indicaron que la dosis alta del benzotropano incrementó significativamente la expresión de la proteína en el estriado dorsolateral (DL) pero no en las demás regiones analizadas (estriado dorsomedial (DM), *core* y *shell* del NAc), mientras que produjo un decremento con la dosis baja y moderada tanto en regiones dorsales como ventrales, al comparar con el grupo que recibió solución salina. Por otra parte la cocaína incrementó la expresión de c-Fos tanto en el NAc *core* como en el estriado DL y DM pero no en el *shell*, resultado que muestra claras diferencias

entre ambas sustancias en su capacidad de inducir la expresión de la proteína en estas áreas cerebrales (Anexo artículo 1 figura 1c, 1d, 1e).

Basándonos en el trabajo publicado previamente por Li *et. al.* iniciamos una serie de estudios utilizando el modelo de CPP con los que tratamos de determinar la manera en la que el análogo AHN 1-055 influía en la recompensa inducida por la cocaína. A diferencia del trabajo de Li *et. al.* los animales recibieron diferentes dosis de AHN 1-055 (0, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) como pretratamiento seguido 1 hora más tarde de cocaína (0, 15 mg/kg i.p.). Los resultados mostraron que por sí solo el AHN 1-055 no producía en los animales ningún tipo de aversión o preferencia por el lugar en el que habían recibido la sustancia, pero en cambio indujo un bloqueo dependiente de la dosis en la preferencia de lugar inducida por la cocaína (Anexo artículo 1 figura 3a). Durante las sesiones de condicionamiento en las que los animales recibieron los tratamientos, la actividad locomotora fue también analizada. Los datos confirmaron la leve inhibición por parte de la dosis baja y revelaron una atenuación en la locomoción inducida por cocaína por parte de la dosis alta de AHN 1-055 (Anexo artículo 1 figura 3b).

Con el objetivo de determinar si este bloqueo en la locomoción era debido a que los animales habían alcanzado un “efecto techo” y no podían expresar una locomoción mayor, realizamos otro experimento en el que administramos a los animales como pretratamiento otro estimulante, anfetamina (4 mg/kg i.p.) o un inhibidor de la recaptura de DA, nomifensina (20 mg/kg i.p.), solos o en combinación con cocaína (15 mg/kg i.p.) durante un periodo de 5 días consecutivos en los que la actividad locomotora fue monitorizada durante 20 minutos. Las dosis de cocaína, anfetamina y nomifensina empleadas fueron seleccionadas en base a ensayos preliminares de dosis-actividad locomotora y CPP realizados en nuestro laboratorio. En el primer caso, la administración de anfetamina y cocaína indujo un tipo de estereotipias no incompatibles con la locomoción, denominadas estereotipias locomotoras (Bonasera *et al.*, 2008) (*route tracing stereotypies*), caracterizadas por la repetición selectiva de determinados recorridos. Cuando combinamos la cocaína con nomifensina, la estimulación locomotora inducida por

la droga fue atenuada, pero apreciamos la presencia de intensas estereotipias tras administraciones repetidas. Estos experimentos nos permitieron por lo tanto concluir que el análogo AHN 1-055 no se comporta como una droga psicoestimulante clásica como es la anfetamina, ni como un inhibidor típico de la recaptura de DA como es la nomifensina (Anexo artículo 1 figura 2).

Paralelamente a los estudios de condicionamiento con el análogo AHN 1-055, realizamos una serie de análisis inmunohistoquímicos en los que medimos la expresión de la proteína c-Fos con el objetivo de relacionar el comportamiento observado con alguna medida biológica de activación cerebral. Realizamos la cuantificación de la proteína c-Fos en diferentes regiones estriatales, incluyendo el *core* y *shell* del NAc y las regiones DM y DL del estriado, en muestras cerebrales de animales que habían sido sacrificados después de la última sesión de condicionamiento y en la que habían sido tratados bien con cocaína, el análogo AHN 1-055 o con la combinación de ambos. Los análisis revelaron que el AHN 1-055 por sí mismo no produjo ninguna variación en la inducibilidad de la proteína c-Fos en ninguna de las regiones del estriado. A diferencia del análogo, administraciones repetidas de cocaína provocaron fuertes cambios en la expresión de la proteína, tanto en el *core* y *shell* del NAc como en el estriado DM. El pretratamiento con AHN 1-055 atenuó la inducción de c-Fos, de manera dependiente de la dosis, llegando la dosis más elevada del fármaco a disminuir de forma significativa el número de células c-Fos positivas en todas las áreas cerebrales en las que la cocaína aumentó la expresión de la proteína (Anexo artículo 1 figura 4).

2.- EL INHIBIDOR DE LA CAPTURA DE DOPAMINA, JHW 007, BLOQUEA LA RECOMPENSA, LA ESTIMULACIÓN LOCOMOTORA Y LA SENSIBILIZACIÓN INDUCIDA POR LA COCAÍNA.

El objetivo general de los experimentos realizados con el JHW 007 fue caracterizar los efectos del análogo en modelos preclínicos de adicción a la cocaína. Este objetivo general puede desdoblarse en tres objetivos específicos.

El primero de ellos fue estudiar los efectos recompensantes del JHW 007 en el paradigma de CPP así como la capacidad del análogo de modificar el CPP inducido por cocaína. Para ello los animales recibieron diferentes dosis de JHW 007 (0, 1, 3 y 10 mg/kg i.p.) como pretratamiento y cocaína (0, 15 mg/kg i.p.) como postratamiento 1 hora después. Los resultados mostraron que, a diferencia de la cocaína que sí produjo CPP, el JHW 007 no indujo ni preferencia ni aversión al lugar a ninguna de las dosis a las que fue administrado y además fue capaz de atenuar el condicionamiento inducido por la droga (Anexo artículo 2 figura 1)

El segundo de los objetivos planteados fue el estudio, utilizando el modelo experimental del CPP, de la actividad locomotora inducida por los diferentes tratamientos durante las sesiones de condicionamiento. El análisis de los datos reveló que, a diferencia de la cocaína que incrementó notablemente la locomoción de los animales, el análogo no produjo efectos estimulantes cuando fue administrado solo y fue capaz de atenuar el efecto hiperlocomotor cuando se administró en combinación con la droga (Anexo artículo 2 figura 2).

Por último, investigamos los comportamientos relacionados con la ansiedad que podían derivarse del tratamiento repetido con el análogo. Testamos a los animales en un laberinto en cruz elevado (*elevated plus maze*, EPM) después de haber recibido JHW 007 (0, 5 y 15 mg/kg i.p.), cocaína (0, 15 mg/kg i.p.) o la combinación de ambos. Los tratamientos fueron administrados durante 8 días consecutivos y las variables analizadas fueron el tiempo pasado en los brazos

abiertos, el número de veces que el animal asoma la cabeza y la actividad locomotora. La conducta de asomar la cabeza es una medida de asunción de riesgos que se ha relacionado con niveles bajos de ansiedad. La exposición al EPM se realizó tanto el día 1 de tratamiento (exposición aguda) como el día 8 (exposición subcrónica). Los resultados de la exposición aguda indicaron que el JHW 007, la cocaína y la combinación de ambas sustancias producían una respuesta variable en el tiempo pasado en los brazos abiertos. Todos los compuestos redujeron este valor pero las diferencias con respecto al valor del grupo control no fueron significativas (Anexo artículo 2 figura 3a). El número de veces que los animales asomaron la cabeza por los brazos abiertos disminuyó de manera dependiente de la dosis tanto en los animales que habían recibido JHW 007, cocaína o la combinación (Anexo artículo 2 figura 3b). En cuanto a la actividad locomotora todos los tratamientos administrados indujeron un decremento de manera dependiente de la dosis (Anexo artículo 2 figura 3c). Tras la administración de los tratamientos durante 8 días, los animales fueron reexpuestos al EPM y las mismas variables fueron medidas. El tiempo pasado en los brazos abiertos fue modificado significativamente por los tratamientos. El JHW 007 y la cocaína redujeron el valor de esta variable ejerciendo la dosis más baja un efecto más efectivo. La dosis alta de JHW 007 indujo una respuesta inconsistente en la que 4 animales mostraron respuestas similares a las de los controles y otros 3 exhibieron una clara evitación a los brazos abiertos, de manera que el valor para este grupo experimental no difirió del grupo control. La combinación de ambas sustancias redujo significativamente el tiempo pasado en los brazos abiertos (Anexo artículo 2 figura 4a). Al igual que en la exposición aguda, los resultados para el número de veces que los animales asomaban la cabeza en los brazos abiertos fueron significativos. Bajo los efectos tanto de la cocaína como del JHW 007, los animales realizaron menos veces este comportamiento. Mientras que la cocaína lo disminuyó de manera dependiente de la dosis, la dosis alta y baja de JHW 007 fueron igual de efectivas. La combinación de JHW 007 y cocaína produjo también una reducción en esta variable (Anexo artículo 2 figura 4b). Por último, el análisis de la actividad locomotora en el EPM mostró un efecto llamativo. Las dosis bajas de JHW 007 y de cocaína no indujeron

cambios significativos en la actividad locomotora tras la administración subcrónica. La administración repetida de la dosis alta de cocaína no fue inhibitoria, como sí lo fue tras la administración aguda, e incluso produjo un efecto estimulante en comparación con el grupo control. Estos animales tratados repetidamente con cocaína se desplazaban de uno de los brazos cerrados al otro de manera estereotipada. Ni este comportamiento estereotipado ni el efecto estimulante observado fue patente en los animales que recibieron el JHW 007 antes que la cocaína, los cuales mostraron una atenuación dependiente de la dosis de la actividad locomotora inducido por la droga (Anexo artículo 2 figura 4c).

Para estudiar la capacidad del JHW 007 para modular los efectos locomotores tras una exposición subcrónica, analizamos la locomoción en un campo abierto. El protocolo de administración de las drogas fue el mismo que el empleado en el experimento con el EPM, utilizando sólo la dosis alta de ambas sustancias. La administración aguda de cocaína (15 mg/kg i.p.) produjo un potente incremento en la actividad locomotora que fue totalmente abolido con el pretratamiento de JHW 007 (15 mg/kg i.p.). Con la exposición repetida, la cocaína produjo una sensibilización locomotora que se hizo patente en los primeros 5-10 minutos como un fuerte incremento en la locomoción, mientras que el análogo produjo una suave pero no significativa elevación de este parámetro. Cuando el JHW 007 fue administrado antes de la cocaína, no fue capaz de prevenir el efecto locomotor inducido por ésta, el cual fue muy similar al evocado con la administración aguda de cocaína en cuanto a intensidad y cinética. Sí fue capaz, sin embargo, de bloquear el componente de sensibilización observado en los primeros minutos de la sesión (Anexo artículo 2 figura 5).

3.- PROPIEDADES TERAPÉUTICAS DE UN INHIBIDOR DE LA CAPTURA DE DOPAMINA EN MODELOS ANIMALES DE ADICCIÓN A LA ANFETAMINA.

Teniendo en cuenta la implicación del transportador de DA en el modo de acción de la anfetamina, era plausible plantearse una posible efectividad de estos análogos en diferentes modelos de adicción a anfetamina que no habían sido investigados hasta la fecha. En este trabajo elegimos como análogo de la BZT el AHN 1-055 y empleamos el CPP, la actividad locomotora y la SA como paradigmas experimentales.

Para testar la capacidad del análogo de bloquear los efectos recompensantes de la anfetamina utilizamos el modelo de CPP. Los animales recibieron diferentes dosis de AHN 1-055 (0, 3 y 10 mg/kg i.p.) como pretratamiento 1 hora antes de administrar distintas dosis de anfetamina (0, 0.5 y 4 mg/kg i.p.). El análisis de los datos indicó que no había diferencias entre los grupos en los niveles basales de preferencia por ninguno de los dos compartimentos. Finalizadas las sesiones de condicionamiento los datos revelaron que la exposición a anfetamina sólo indujo CPP con la dosis más alta administrada mientras que, como ya habíamos demostrado previamente (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009), el AHN 1-055 no indujo ni preferencia ni aversión por el compartimento asociado a ninguna de las dosis administradas. El pretratamiento de AHN 1-055 además bloqueó de manera dependiente de la dosis el CPP inducido por la dosis alta de anfetamina (Anexo artículo 3 figura 1).

Los resultados de la actividad locomotora recogidos durante las sesiones de condicionamiento con drogas mostraron que la dosis alta de anfetamina produjo un fuerte incremento en la locomoción mientras que la dosis baja no la indujo de manera significativa. Este efecto hiperlocomotor inducido por la anfetamina fue atenuado con la administración del AHN 1-055 como

pretratamiento, siendo esta atenuación de un 45-60% a lo largo de las sesiones (Anexo artículo 3 figura 2).

Con el objetivo de examinar los mecanismos neurales que podían subyacer a la capacidad del AHN 1-055 de prevenir los efectos recompensantes y estimulantes de la administración repetida de anfetamina los animales fueron sacrificados al finalizar el test de condicionamiento y la acumulación de la proteína Δ FosB fue cuantificada. La anfetamina incrementó la expresión de la proteína tanto en el *core* como en el *shell* del NAc después de los 4 días de tratamiento, mientras que se observó una tendencia por parte del AHN 1-055 de mitigar la expresión constitutiva de la proteína en el *shell* cuando fue administrado solo. En paralelo con los resultados de comportamiento observados, el pretratamiento con el análogo atenuó la acumulación de la proteína inducida por la anfetamina en ambas regiones, siendo la reducción en el *shell* de un 62% (Anexo artículo 3 figura 3).

La capacidad de la anfetamina de inducir sensibilización debido a sus efectos locomotores es conocida desde hace tiempo (Pierce *et al*, 1997). Por ello nos planteamos testar si el pretratamiento con AHN 1-055 podría influir en la expresión de la sensibilización inducida por la droga. Para ello administramos AHN 1-055 (0 y 10 mg/kg i.p.) seguido 1 hora después de anfetamina (0 y 4 mg/kg i.p.). Las dosis de los compuestos fueron escogidas en función a los resultados de actividad locomotora obtenidos previamente en el experimento de CPP. Los animales recibieron los tratamientos durante 4 días consecutivos y la actividad locomotora fue medida durante 20 minutos. Al mismo tiempo, dos investigadores ciegos a los tratamientos administrados tomaron medidas de comportamientos estereotipados como control de la inducción de respuestas motoras típicamente asociadas con una excesiva estimulación dopaminérgica. La exposición repetida al AHN 1-055 no indujo cambios significativos en la actividad locomotora a lo largo de los 4 días, mientras que las inyecciones de anfetamina fueron progresivamente aumentando la hiperactividad de los animales a medida que transcurrían los días, siendo la diferencia entre el día 1 y el día 4 significativa. El pretratamiento con el AHN 1-055 fue capaz de bloquear el incremento observado con la administración

repetida de anfetamina, incluyendo los componentes asociados con la sensibilización (Anexo artículo 3 figura 4a). El análisis de la estereotipia reveló que los animales expuestos a anfetamina de manera repetida desarrollaban una serie de comportamientos anómalos, no incompatibles con la locomoción ni con la sensibilización (estereotipias motoras, *route tracing stereotypies* (Bonasera *et al*, 2008)) como se observó en experimentos anteriores (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009). En este caso, el pretratamiento con el AHN 1-055 produjo un ligero pero significativo incremento en la estereotipia cuando se administró solo, lo que podría explicar por qué administrado como pretratamiento no fue capaz de atenuar las conductas estereotipadas inducidas por la anfetamina (Anexo artículo 3 figura 4b).

Habiendo obtenido efectos terapéuticos con el AHN 1-055 en los experimentos anteriores con anfetamina nos planteamos testar la posibilidad de que el análogo pudiera actuar como una medicación de reemplazo en un modelo de SA de anfetamina. Para ello realizamos un experimento en el que ratas entrenadas a autoadministrarse anfetamina (0.1 mg/kg por infusión) con un historial estable de consumo durante un tiempo determinado (Anexo artículo 3 figura 5a) fueron pretratadas con dos dosis diferentes de fármaco (5 y 10 mg/kg i.p.) 1 hora antes de la sesión de SA. Los resultados indicaron que el pretratamiento fue capaz de reducir también el consumo de anfetamina de manera dependiente de la dosis, siendo la dosis más elevada la que produjo un efecto significativo (Anexo artículo 3 figura 5b).

4.- EL INHIBIDOR ATÍPICO DEL TRANSPORTE DE DOPAMINA, JHW007, PREVIENE LA SENSIBILIZACIÓN Y LA REORGANIZACIÓN SINÁPTICA EN EL NÚCLEO ACCUMBENS INDUCIDA POR ANFETAMINA

Los resultados expuestos hasta ahora han demostrado que estas moléculas análogas a la BZT se comportan como inhibidores atípicos de la captura de DA y exhiben propiedades funcionales y farmacológicas que difieren de las mostradas por los estimulantes clásicos como la cocaína y la anfetamina. A pesar de ser también moléculas con una elevada afinidad por el DAT, se ha demostrado que generalmente muestran una limitada capacidad para incrementar la actividad locomotora e inducir CPP (Katz *et al*, 2004; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b), así como una limitada eficacia reforzante (Ferragud *et al*, 2009; Hiranita *et al*, 2009). Los dos análogos que hemos caracterizado en nuestro laboratorio han mostrado también la capacidad de bloquear la sensibilización locomotora inducida por la administración repetida tanto de cocaína como de anfetamina (Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b). Los experimentos presentados en este trabajo se han centrado en investigar los mecanismos que subyacen a la capacidad del JHW 007 de atenuar la sensibilización inducida por anfetamina incluyendo el estudio de patrones de remodelación sináptica en el NAc.

En primer lugar estudiamos si el JHW 007 podría afectar a la expresión de la sensibilización inducida por anfetamina a largo plazo. Para ello los ratones recibieron una inyección diaria de solución salina, anfetamina (2.5 mg/kg i.p.), JHW 007 (10 mg/kg i.p.) o la combinación de ambas sustancias, recibiendo en este caso el análogo 1 hora antes que la anfetamina. Los tratamientos fueron administrados durante 3 semanas consecutivas y la actividad locomotora fue medida el primer y último día. Los resultados indicaron que, tanto con la administración aguda como crónica, la anfetamina incrementó fuertemente los

niveles de locomoción al compararlos con el grupo control, mientras que los niveles inducidos por el JHW 007 se mantuvieron bajos. Administrado como pretratamiento, el análogo bloqueó la actividad locomotora inducida por la anfetamina (Anexo artículo 4 figura 2). Después de las 3 semanas de tratamiento los animales permanecieron libres de droga otras 3 semanas. Pasado este tiempo, los ratones recibieron un *challenge* de anfetamina (1 mg/kg i.p.) o solución salina en dos días de manera contrabalanceada. Como se esperaba, los datos mostraron que el *challenge* con salina no produjo diferencias en la locomoción, mientras que la anfetamina indujo, en los animales que habían sido tratados solo con anfetamina, un efecto de sensibilización evidente durante los primeros 10 minutos que se expresó como un fuerte incremento en la actividad locomotora. En los animales que habían recibido el JHW 007 como pretratamiento antes de la anfetamina, este efecto de sensibilización fue claramente bloqueado y aquellos animales que recibieron únicamente el análogo tampoco mostraron sensibilización. Destaca de este último grupo experimental que su respuesta al *challenge* con anfetamina fuera diferente a la exhibida por el grupo control, siendo para ambos grupos la primera vez que recibían la droga. Este grupo tratado previamente con JHW 007 mostró niveles más bajos que el control como respuesta a la anfetamina, lo que sugiere que una exposición anterior al análogo influye en los efectos posteriores de la anfetamina (Anexo artículo 4 figura 3).

Con el propósito de estudiar los cambios neuroadaptativos de los animales sensibilizados, los cerebros fueron procesados con la técnica de Golgi y realizamos reconstrucciones de las neuronas espinosas medianas (*medial spiny neurons*, MSN) localizadas en el NAc. La arborización dendrítica, la longitud de la dendritas y la densidad de espinas fueron las variables estudiadas. El número de intersecciones en los anillos obtenido con el método de Sholl fue utilizado como medida para estimar el grado de ramificación del árbol dendrítico de cada neurona. Los datos revelaron que los animales que habían sido tratados con anfetamina presentaban un mayor número de intersecciones, siendo este valor significativo en el anillo número 2 desde el soma (Anexo artículo 4 figura 4). El análisis de la

longitud de las dendritas mostró también un incremento en el grupo que había sensibilizado al tratarlo con anfetamina. De acuerdo con los resultados comportamentales, la administración del JHW 007 previno de este incremento observado en los animales sensibilizados (Anexo artículo 4 figura 5a). La cuantificación del número de espinas indicó un incremento de esta variable en el grupo sensibilizado, efecto que no estuvo presente en los grupos que habían recibido el análogo (Anexo artículo 4 figura 5b). Para confirmar este resultado un grupo diferente de animales fue tratado en las mismas condiciones. Sus cerebros fueron procesados para microscopía electrónica (EM) y con ellos cuantificamos el número de sinapsis asimétricas en el NAc. Los resultados mostraron un incremento en la densidad de sinapsis asimétricas en el grupo tratado con anfetamina. El JHW007, que no modificó esta variable cuando fue administrado solo, previno este incremento inducido por la anfetamina cuando fue dado como pretratamiento (Anexo artículo 4 figura 6).

Discusión

El desarrollo de nuevos tratamientos farmacológicos que puedan servir como medicaciones de reemplazo eficaces para tratar el problema de la adicción a estimulantes es actualmente una de las líneas de investigación más importantes en este campo. Los esfuerzos se han centrado en aquellos compuestos que tienen potencial para competir con sustancias estimulantes como la cocaína o anfetamina por la unión al transportador de DA pero sin mostrar los mismos efectos. A lo largo de esta tesis se han descrito una serie de experimentos que han demostrado que estas moléculas análogas a la BZT, inhibidoras de la captura de DA al igual que la cocaína o la anfetamina, muestran una serie de características neurofarmacológicas y psicofarmacológicas diferentes que parecen ser consistentes con lo que se piensa que puede ser una medicación de reemplazo efectiva para el tratamiento de la adicción (Katz et al, 1997; Raje et al, 2005).

Los efectos paradójicos del AHN 1-055 obtenidos en los ensayos de locomoción fueron consistentes con los obtenidos previamente por otro laboratorio (Li *et al*, 2005). Las causas farmacológicas que puedan explicar el efecto inhibitorio obtenido con la administración de la dosis más baja del análogo no están claras. Una posible explicación podría ser que la dosis baja de AHN 1-055 produce leves elevaciones en la concentración de DA extracelular, que preferentemente activaría los autoreceptores de DA produciendo como resultado un decremento neto en la transmisión dopaminérgica. Además, elevaciones en la concentración de DA extracelular pueden activar los receptores postsinápticos D2/D3. La estimulación selectiva de estos receptores se ha asociado con una inhibición motora (Canales and Iversen, 1998, 2000) . El patrón bifásico observado tras el tratamiento con AHN 1-055, no es un patrón característico producido por la administración de estimulantes clásico como la cocaína o anfetamina.

La curva bifásica que representa el efecto dosis-respuesta locomotora obtenida tras una administración aguda del análogo AHN 1-055, se relacionó con cambios bifásicos en la activación de genes de expresión temprana en la región del estriado. Los análisis mostraron que la dosis mayor del análogo indujo

elevaciones en la expresión de la proteína c-Fos en el estriado DL, mientras que las dosis bajas y moderadas disminuyeron la expresión basal de la proteína aunque no de forma significativa. De nuevo, encontramos diferencias en el patrón de activación entre los análogos de la BZT y la cocaína, la produjo fuertes efectos en la inducción de la expresión de c-Fos tanto en regiones estriatales ventrales como dorsales como ha sido demostrado previamente (Canales, 2005; Canales and Graybiel, 2000). Otros psicoestimulantes motores entre los que encontramos la anfetamina y el metilfenidato también difieren del AHN 1-055 en cuanto a esta selectividad dorsal-ventral (Chase *et al*, 2005; Moratalla *et al*, 1992; Robertson and Jian, 1995). Los efectos observados en el estriado DL, evocados por el AHN 1-055, pueden ser atribuidos no sólo a la actividad dopaminérgica sino también, al perfil anticolinérgico de estas sustancias, como se ha demostrado con otros receptores antagonistas muscarínicos que inducen la expresión de c-Fos en esta área cerebral (Bernard *et al*, 1993).

En los experimentos de interacción llevados a cabo con el AHN 1-055, anfetamina y nomifensina, el análogo indujo una suave pero significativa elevación en la locomoción con la dosis alta. Un efecto parecido fue observado empleando el modelo de CPP donde la estimulación locomotora fue aparente con la administración aguda del AHN 1-055 y fue disminuyendo tras exposiciones repetidas del análogo (datos no mostrados en la gráfica). El AHN 1-055 es un compuesto de efectos duraderos que se encuentra en concentraciones elevadas en el plasma y cerebro durante un prolongado periodo de tiempo, que en ratas puede superar las 24 horas (Raje *et al*, 2003). Es posible que la acumulación de AHN 1-055 en el cerebro tras la administración diaria contrarreste la expresión de tolerancia, aunque más experimentos son necesarios para testar esta hipótesis. El resultado relevante obtenido en ambos paradigmas experimentales fue que el AHN 1-055 atenuó significativamente la actividad locomotora inducida por la cocaína. En el primer experimento de interacción el AHN 1-055 podía haber potenciado los efectos locomotores de la cocaína ya que el nivel de locomoción alcanzado con la dosis de referencia se encontraba lejos del nivel máximo. Evidencia de esto es el

hecho de que la combinación de anfetamina y cocaína indujo niveles mucho más altos de hiperestimulación. Esta atenuación en la actividad locomotora observada en los animales que fueron pretratados con el AHN 1-055 no fue debida a un incremento en la manifestación de comportamientos anómalos o estereotipados. Contrario a los efectos del análogo la anfetamina administrada sola, incrementó los niveles de actividad locomotora inducida por la cocaína y al combinarse con ella, además de inducir una mayor hiperestimulación, incrementó la expresión de estereotipias motoras no incompatibles con la locomoción, consistentes en la repetición de determinados patrones de recorrido (Bonasera *et al*, 2008). Por otro lado, el AHN 1-055 claramente difirió de la nomifensina, la cual también inhibió la actividad locomotora inducida por la cocaína pero produciendo, en este caso, fuertes estereotipias totalmente incompatibles con la actividad exploratoria.

Basándonos en el trabajo publicado previamente por Li *et. al.* (2005) y habiendo demostrado que el AHN 1-055 ejercía acciones antagonistas a las inducidas por la cocaína, nos planteamos testar la hipótesis de si estos derivados de la BZT podrían influir en los efectos subjetivos evocados por las drogas, medido con el paradigma de CPP y correlacionar el efecto con alguna medida de activación en áreas cerebrales relacionadas con la recompensa. La administración de AHN 1-055 no produjo condicionamiento 1 hora después de haber sido administrado a ninguna de las dosis testadas (1, 3, 10 mg/kg i.p.), llegando a ser la dosis más alta superior a la testada por Li *et. al.*. Administrado también 1 hora antes del condicionamiento, el JHW 007 no produjo CPP a ninguna de las dosis (1, 3, 10 mg/kg i.p.), dato que puede en parte apoyar el encontrado por Li *et al.*, ya que sus sujetos muestran condicionamiento solo a los 45 minutos de haber recibido 10 mg/kg del análogo, pero no a los 90 minutos. A diferencia del trabajo publicado por Li *et al.*, nosotros administramos también ambos análogos como pretratamiento 1 hora antes de inyectar la cocaína e iniciar la sesión de condicionamiento. Los resultados revelaron que ambos análogos eran capaces de atenuar el condicionamiento inducido por la droga, de manera dependiente de la dosis, alcanzando un bloqueo significativo con la dosis mayor de análogo administrada (10 mg/kg). El AHN 1-055 es un

antagonista muscarínico de receptores M1, lo que hace que no podamos pasar por alto el hecho de que muchos de sus efectos puedan deberse a esta característica. Sin embargo, evidencias actuales argumentan en contra de esta posibilidad. Una deficiencia en el receptor M1 conduce a una elevada transmisión dopaminérgica y agudiza la respuesta locomotora de la anfetamina, sugiriendo que la actividad tónica del receptor se opone, en lugar de facilitar, las acciones de la DA (Gerber *et al*, 2001). Además, los datos obtenidos con el JHW 007, el cual presenta una afinidad mucho menor por los receptores M1, sugiere que las acciones antagonistas sobre estos receptores no son necesarias para prevenir la recompensa ni la estimulación locomotora inducida por las drogas, aunque no hay que pasar por alto este perfil anticolinérgico del AHN 1-055 y seguir investigándolo en relación a su posible potencial terapéutico. En un trabajo anterior (Desai *et al*, 2005b) se demostró que la tasa de ocupación del JHW 007 sobre el DAT es más lenta que la de la cocaína, de manera que algunos de los efectos inducidos por ésta podían ser bloqueados con la administración del análogo, lo que parece sugerir que la interferencia con el DAT es probablemente suficiente para prevenir los efectos recompensantes de la cocaína.

La anfetamina al igual que otros estimulantes ejerce sus efectos modulando la actividad de los sistemas monoaminérgicos. Se sabe que parte de su efecto se debe a la activación de los sistemas noradrenérgicos y serotoninérgicos (Rothman and Baumann, 2006a; Sofuoglu and Sewell, 2009) pero se cree que sus efectos estimulantes y euforizantes se deben principalmente a la hiperactivación del sistema dopaminérgico (Drevets *et al*, 2001; Lott *et al*, 2005). Teniendo en cuenta la implicación del transportador de DA en el modo de acción y en los efectos de la anfetamina, nos planteamos la hipótesis de que estas moléculas pudieran ser consideradas como una posible medicación a tener en cuenta para el tratamiento de la adicción a la anfetamina y a sustancias estructuralmente relacionadas.

Como habíamos predicho el AHN 1-055 bloqueó el efecto recompensante y estimulante de la anfetamina en el modelo de CPP sin inducir, como ya habíamos demostrado previamente (Velazquez-Sanchez *et al*, 2009),

ningún efecto por sí mismo. Como medida neurobiológica cuantificamos la proteína Δ FosB en el NAc, ya que esta proteína incrementa su expresión y se acumula en respuesta al efecto recompensante inducido tanto por sustancias naturales como por drogas e incrementa la motivación de búsqueda (Kelz et al, 1999; McClung and Nestler, 2003; Olausson et al, 2006). Al contrario que otros inhibidores del DAT como son la cocaína o el metilfenidato que sí producen una acumulación de la proteína en el NAc (Hope et al, 1994; Kim et al, 2009), el AHN 1-055 no la produjo y además redujo su expresión tras el condicionamiento con anfetamina de manera evidente en el *shell* del NAc, el cual se considera por sus conexiones con el hipotálamo y ATV parte clave del circuito límbico mediador del comportamiento apetitivo, respuestas víscero-endocrinas y efectos incondicionados de los estímulos motivacionalmente llamativos, incluyendo las drogas de abuso (Kelley, 1999; Meredith et al, 2008). Los datos recopilados sugirieron que uno de los mecanismos por los cuales el AHN 1-055 podría prevenir el efecto recompensante de la anfetamina es interfiriendo con los cambios en la expresión de proteínas producida por la administración repetida de la droga. Estos cambios en la expresión génica son posiblemente secundarios a las interacciones farmacológicas del AHN 1-055 y de la anfetamina, las cuales probablemente resultan en una menor entrada de anfetamina en el citosol y a una reducción del flujo de DA a través del transporte inverso.

Examinando con más detenimiento la capacidad de los análogos de bloquear el CPP inducido por drogas, además de la recompensa tenemos que considerar la implicación de otros factores. El condicionamiento de lugar requiere del procesamiento simultáneo del estímulo incondicionado (droga), de la formación de una representación cognitiva del contexto en el que el condicionamiento se está llevando a cabo, de la asociación entre la droga y la representación del contexto y de una memoria a largo plazo de esta asociación (Tzschentke, 2007). Los análogos de la BZT que hemos estudiado, tanto el AHN 1-055 como el JHW 007, contrariamente a la mayoría de las drogas adictivas, no inducen CPP cuando son administradas solas y lo previenen cuando son

administradas antes que la cocaína o la anfetamina. Los datos obtenidos de nuestros experimentos no nos permiten determinar si los análogos bloquean la recompensa inducida por las drogas o si interfieren en alguno de los procesos de aprendizaje mencionados anteriormente. Sin embargo, la fuerte asociación existente entre la expresión de Δ FosB y la sensibilidad a recompensas naturales e inducidas por drogas (McClung *et al*, 2003; Olausson *et al*, 2006) favorece la hipótesis de que los análogos, en este caso el AHN 1-055, bloquean la recompensa inducida por la droga.

Recientes estudios moleculares han mostrado que la DA se une al transportador en una zona hidrofóbica entre los segmentos transmembrana 1, 3, 6 y 8 (Beuming *et al*, 2008; Huang and Zhan, 2007). Utilizando otras técnicas como la mutagénesis se ha descubierto que estimulantes como la anfetamina o la cocaína e incluso análogos de la BZT como el JHW 007 o MFZ 2-71, solapan extensamente con el lugar de unión de la DA (Beuming *et al*, 2008; Indarte *et al*, 2008). En relación a estos hallazgos moleculares, la explicación más simple de los resultados obtenidos en el CPP es que el tratamiento con estos análogos disminuye la capacidad de la cocaína y anfetamina para inducir efectos comportamentales y neuroquímicos debido a que compiten directamente por la unión al DAT, aunque más experimentos son necesarios para clarificar esta hipótesis.

Los efectos relacionados con la ansiedad que pueden inducir estos fármacos no habían sido estudiados con anterioridad. Los resultados mostraron que tanto la cocaína, el JHW 007 como la combinación de ambos, administrados tanto en agudo como de manera subcrónica, presentaban un perfil ansiogénico en el EPM. Estudios previos han evidenciado que tanto la administración aguda como crónica de cocaína, evocan comportamientos relacionados con la ansiedad en este mismo paradigma experimental (Muller *et al*, 2008; Yang *et al*, 1992). Los efectos ansiogénicos de la cocaína o del JHW 007 fueron más evidentes tras una administración subcrónica, en la que se observó una clara evitación de los brazos abiertos. A pesar de que el análogo mostró capacidad para bloquear los efectos recompensantes y estimulantes de la cocaína, no impidió la aparición de dichos

comportamientos cuando se administró como pretratamiento antes que la droga, debido posiblemente al hecho de que los producía por sí mismo. Este efecto ansiogénico del JHW 007 y la cocaína fue independiente a la actividad locomotora, como muestran los resultados de locomoción obtenidos en el EPM. Mientras que el análogo y la cocaína inhibieron la locomoción tras una exposición aguda, la administración subcrónica de droga invirtió este efecto induciendo una fuerte locomoción, resultado que no se observó con la administración repetida de JHW 007. De especial interés fue el hecho de que el pretratamiento con JHW 007 fue capaz de bloquear este “efecto rebote” en la locomoción sugiriendo que el análogo puede bloquear alguno de los efectos a largo plazo de la cocaína. Los resultados obtenidos en el campo abierto donde las condiciones estresantes se habían minimizado, indicaron que el JHW 007 bloqueó el componente sensibilizador asociado con una exposición subcrónica de cocaína, pero que no eliminó completamente la estimulación inducida por la misma. Como se ha comentado anteriormente, el hecho de que estos análogos solapen en el mismo lugar de unión que la cocaína, la anfetamina y la DA en el transportador (Beuming *et al*, 2008; Huang *et al*, 2007; Indarte *et al*, 2008), puede ser la hipótesis más plausible para explicar por qué el JHW 007 previene de alguno de los efectos inducidos por la cocaína.

Las modificaciones en la estructura de las neuronas inducidas por la exposición a estimulantes son conocidas desde hace décadas. Algunas de estas neuroadaptaciones han sido relacionadas con el fenómeno de la sensibilización comportamental, la búsqueda de drogas y la adicción (Robinson *et al*, 1993; Robinson and Berridge, 2003). Se ha postulado que la capacidad de algunas drogas de inducir cambios en la conectividad sináptica, como por ejemplo incrementar la densidad de espinas en neuronas de regiones cerebrales relacionadas con la recompensa, puede mediar en la sensibilidad a largo plazo y en el patrón de consumo compulsivo observado en humanos adictos (Robinson and Kolb, 2004). La administración repetida de cocaína o anfetamina produce alteraciones persistentes en la locomoción (sensibilización) las cuales pueden derivar de la

reorganización de sinápsis en circuitos específicos. Los estudios con Golgi han revelado que las drogas estimulantes, administradas tanto de forma pasiva por el experimentador como de forma activa por el mismo animal, pueden incrementar la densidad de espinas en las MSN del NAc así como producir un incremento en la arborización dendrítica (Crombag *et al*, 2005; Robinson *et al*, 2004). Sin embargo, el papel de estos cambios estructurales en la sensibilización continua siendo controvertido (Kim *et al*, 2009).

Los experimentos presentados en esta tesis han evidenciado que el JHW 007 antagoniza los efectos estimulantes, incluida la sensibilización, inducidos por la anfetamina sin producir ningún efecto por sí mismo. Los resultados han indicado que tanto el JHW 007 como el AHN 1-055 son capaces de atenuar los efectos psicomotores a largo plazo inducidos por una administración repetida de estimulantes (Velazquez-Sanchez *et al*, 2010a; Velazquez-Sanchez *et al*, 2010b). Un estudio reciente ha demostrado que el JHW 007 exhibe dos fases de asociación con el DAT: una fase rápida con una vida media de segundos, seguida de una lenta con una vida media de decenas de segundos. Este estudio sugiere que es esta fase rápida de asociación con el transportador de DA la responsable de que el análogo muestre efectos diferentes a los de la cocaína y a que sea capaz de bloquear los efectos inducidos por ésta rápidamente tras la administración (Kopajtic *et al*, 2010). Experimentos de microdiálisis han mostrado que el JHW 007 incrementa los niveles estriatales de DA con menor eficacia que la cocaína. Además, la combinación de cocaína con uno de sus análogos, WIN 35,428, mostró un efecto aditivo mientras que la combinación de cocaína con el JHW 007 produjo un efecto subaditivo, sugiriendo que la cocaína y el JHW 007 tienen modos de acción diferentes (Tanda *et al*, 2009a). Experimentos realizados en nuestro laboratorio, mostraron que la administración de otro análogo de la BZT, el AHN 1-055, no produjo acumulación de la proteína Δ FosB en el NAc y que además el pretatamiento con el análogo redujo drásticamente dicha acumulación inducida por la anfetamina. Por el contrario, otro inhibidor del DAT de acción prolongada como es el metilfenidato, es capaz de inducir sensibilización locomotora (Podet *et*

al, 2010) e incrementar tanto el número de células Δ FosB positivas en el estriado como el número de espinas en las MSN de la región del *core* del NAc (Kim *et al*, 2009). En base a las similitudes en la estructura química de los análogos, es razonable asumir que sus modos de acción y subsecuentes adaptaciones neuroquímicas pueden ser similares. Por lo tanto, una inhibición intracelular en las vías de señalización, incluyendo la acumulación de Δ FosB, podría ser uno de los mecanismos a través de los cuales los análogos de la BZT, como el AHN 1-055 y el JHW 007, previenen algunas de las neuroadaptaciones a largo plazo inducidas por la exposición crónica a psicoestimulantes, como son por ejemplo los cambios en el patrón dendrítico y en la densidad de espinas en las MSN del NAc.

El efecto en la densidad de espinas ha sido correlacionado en varios trabajos con el número de sinapsis. Ambientes complejos y algunos tipos de aprendizaje pueden incrementar la superficie dendrítica de las neuronas corticales, lo cual correlaciona con un incremento en el número de sinapsis (Greenough, 1984; Greenough and Bailey, 1988). De forma análoga, otro estudio ha mostrado una asociación entre el número de ramas y sinapsis en los ganglios simpáticos y parasimpáticos (Purves, 1994). Además, Morshedi *et. al.* (Morshedi *et al*, 2009) han mostrado en uno de sus estudios un incremento significativo en el número de axoespinas asimétricas, pero no en las sinapsis axodendríticas, en la CP medial tras una exposición repetida de anfetamina. Casualmente, Robinson y Kolb habían publicado anteriormente que se producía, tras un tratamiento similar, un aumento en la densidad de las espinas en las dendritas apicales, pero no en las basales, de las neuronas piramidales de la CP (Robinson and Kolb, 1997, 1999). Esta evidencia sugiere que el incremento en la densidad de espinas y proliferación de sinapsis puede ser un fenómeno relacionado que ocurren simultáneamente en respuesta a cambios neuroquímicos persistentes inducidos por psicoestimulantes. Los resultados aportados por nuestros experimentos apoyan resultados previos que indican que ambos procesos concurren tras una exposición crónica de anfetamina. Hasta donde tenemos conocimiento, este es el primer trabajo que identifica una molécula con propiedades terapéuticas que previene tanto las neuroadaptaciones

estructurales como funcionales. El hecho de que el estudio esté limitado a una sola dosis de JHW 007 y anfetamina está justificado por el detallado análisis histológico que conlleva, aunque para entender mejor la relación entre la exposición a las drogas y sus efectos sería necesario un estudio dosis respuesta.

La amplia investigación que se ha llevado a cabo con estos análogos a lo largo de casi dos décadas ha permitido concluir que algunas de estas moléculas mantienen en cierta medida propiedades similares a las de drogas estimulantes. Esto ha sido deducido a partir de algunos experimentos de DD en los que los análogos pueden sustituir parcialmente por cocaína (Katz *et al*, 2001; Katz *et al*, 1999). Sin embargo, estudios recientes han demostrado que la SA de AHN 1-055 es menos potente que la de cocaína y además no genera recaída inducida por el contexto tras la abstinencia (Ferragud *et al*, 2009), sugiriendo que el AHN 1-055 tiene un menor potencial de abuso. Este mismo análogo es capaz de reducir de manera dependiente de la dosis la SA de cocaína (Ferragud *et al*, 2009) y, como se ha mostrado en esta tesis, también el consumo de anfetamina, sugiriendo que en este modelo experimental el análogo se comporta como sustituto de perfil no adictivo. En modelos de SA de estimulantes, los antagonistas dopaminérgicos producen normalmente un desplazamiento de la curva dosis-respuesta hacia la derecha, incrementando la respuesta para compensar el reducido valor subjetivo del estimulante autoadministrado (Ahmed and Koob, 2004; Koob *et al*, 1987; Phillips *et al*, 1994). A pesar de que no controlamos los posibles efectos de intoxicación o estereotipias que podía inducir el AHN 1-055, consideramos que no era lógico deducir que el régimen farmacológico al que estaban sometidos los animales pudiera interferir con la tarea. En otro experimento, un tratamiento similar con el mismo análogo incrementó la respuesta para la obtención de sacarosa, sugiriendo que es poco probable que estos compuestos produzcan algún tipo de alteración motora o motivacional que interfiera con la tarea de presionar la palanca (Ferragud *et al*, 2009). Por el contrario, la reducción en el consumo de anfetamina producida por la administración de AHN 1-055 puede sugerir que el análogo puede sustituir en cierta medida por anfetamina, a pesar de mostrar

características comportamentales claramente diferentes a las suyas, a las de la cocaína e incluso a las de otros inhibidores de la captura de DA como la nomifensina (Ferragud *et al*, 2009; Velazquez-Sanchez *et al*, 2009).

El continuo desarrollo y evaluación de nuevas moléculas análogas a la BZT constituye una línea de investigación importante y actual, a pesar de que estas moléculas fueron originariamente sintetizadas hace ya casi 20 años. El uso de medicaciones que, como estos análogos, puedan actuar como antagonistas bajo condiciones de elevada transmisión dopaminérgica y como agonistas bajo situaciones de depleción, puede constituir uno de los mayores avances en la búsqueda de tratamientos para la adicción a estimulantes. Estas medicaciones podrían actuar como antagonistas cuando, durante una activa búsqueda de droga y consumo, la transmisión se encuentra elevada, sirviendo por tanto como agentes detoxificantes. Por otro lado, podrían comportarse como agonistas durante la abstinencia, cuando se presenta una hipodopaminergia asociada a la retirada de estimulantes, bloqueando la captura y normalizando la transmisión de DA, de manera que se reduciría la probabilidad de recaer en el consumo. Los experimentos realizados y descritos en esta tesis han mostrado que los análogos de la BZT testados en diferentes modelos de adicción a estimulantes poseen propiedades consistentes con este perfil.

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos de los experimentos realizados podemos establecer las siguientes conclusiones:

ESTUDIOS AHN 1-055 Y COCAÍNA

1. Los ensayos de actividad locomotora revelaron que, en comparación con los valores del grupo control, la administración de la dosis alta (10 mg/kg) y baja (1 mg/kg) de AHN 1-055, producen un aumento y un decremento respectivamente, de la actividad locomotora a diferentes tiempos a lo largo de la sesión de 2 horas.
2. El análisis inmunohistoquímico mostró que la dosis alta de AHN 1-055 (10 mg/kg) únicamente incrementa la activación de c-Fos en el estriado DL, al comparar con los valores del grupo control, pero no en el estriado DM ni en el NAc. En cambio, dosis más bajas (1 mg/kg) y moderadas (3 mg/kg) del análogo, disminuyen la expresión basal de la proteína en todas las regiones cuantificadas, aunque no de forma significativa.
3. Los estudios de interacción revelaron que la capacidad de la cocaína de estimular la actividad locomotora se atenúa mediante la administración previa de AHN 1-055, pero no de anfetamina. Esta reducción en la actividad no va acompañada de un incremento en comportamientos estereotipados. En cambio, la combinación de nomifensina, otro inhibidor de la captura de DA con cocaína, disminuye la actividad locomotora induciendo al mismo tiempo fuertes estereotipias.
4. En los experimentos de CPP, observamos que por sí solo el AHN 1-055 carece de efectos recompensantes a las dosis y tiempo a las que fue administrado. Sin embargo, como pretratamiento bloquea de manera dependiente de la dosis el condicionamiento inducido por cocaína.
5. El análisis de las muestras cerebrales recogidas tras la última sesión de condicionamiento mostraron que el AHN 1-055 por sí solo no tiene ningún efecto a ninguna dosis ni en ninguna de las regiones analizadas. En cambio como pretratamiento previene la inducción de la proteína c-Fos tanto en el

core y *shell* del NAc como en el estriado DM, regiones cerebrales en las que la cocaína produce elevaciones.

ESTUDIOS JHW 007 Y COCAÍNA

6. Los estudios de preferencia de lugar determinaron que la exposición de JHW 007 no produce condicionamiento ni aversión a ninguna de las dosis testadas. La administración del análogo previa a la cocaína atenúa la preferencia de lugar inducida por la misma de manera dependiente de la dosis, llegando a producirse un bloqueo significativo con la dosis más elevada del análogo (10 mg/kg).
7. Las medidas de actividad locomotora tomadas durante las sesiones de condicionamiento revelaron que, a diferencia de la cocaína que claramente incrementa la locomoción al comparar con los valores del grupo control, la administración aislada de JHW 007 no modifica esta variable a lo largo de las diferentes sesiones. Sin embargo, el pretratamiento con el análogo reduce la hiperlocomoción inducida por la cocaína de manera dependiente de la dosis, llegando a bloquearla significativamente con la dosis alta (10 mg/kg).
8. Ensayos de sensibilización locomotora realizados en un campo abierto, mostraron que el JHW 007 no produce sensibilización por sí mismo y que, además, previene del componente de sensibilización inducido tras una administración semicrónica de cocaína (8 días).
9. Estudios de ansiedad indicaron que la administración de cocaína, JHW 007 o la combinación de ambos en un laberinto en cruz elevada, produce una reducción en el tiempo pasado en los brazos abiertos y número de veces que el animal asoma la cabeza, siendo estos efectos mucho más evidentes tras una exposición semicrónica a los compuestos (8 días).

ESTUDIOS AHN 1-055 Y ANFETAMINA

10. Experimentos de preferencia de lugar mostraron que, al igual que con la cocaína, el pretratamiento con AHN 1-055 bloquea el condicionamiento inducido por anfetamina de forma dependiente de la dosis.
11. El análisis de la actividad locomotora durante las sesiones de condicionamiento reveló que el pretratamiento con el análogo atenúa de manera significativa la estimulación locomotora inducida por la droga, llegando a reducirse entre un 45-60% a lo largo de las sesiones.
12. El estudio de las muestras cerebrales recolectadas después del test de condicionamiento de preferencia de lugar indicaron que el AHN 1-055 atenúa la acumulación de la proteína Δ FosB inducida por anfetamina cuando es administrado como pretratamiento, llegando esta reducción a ser significativa en el *shell* del NAc.
13. La medición de comportamientos anómalos indicó que el pretratamiento con el análogo produce una forma de estereotipia no incompatible con la locomoción. La dosis elevada de AHN 1-055 (10 mg/kg) no parece atenuar de manera eficaz los comportamientos estereotipados inducidos por la anfetamina.
14. El AHN 1-055 bloquea la autoadministración de anfetamina de manera dependiente de la dosis, siendo la reducción del consumo significativa tras la administración de la dosis alta del análogo (10 mg/kg).

ESTUDIOS JHW 007 Y ANFETAMINA

15. La administración de anfetamina durante 3 semanas, incrementa significativamente los niveles de actividad locomotora comparando con los animales del grupo control. Este incremento en la locomoción inducido por la anfetamina es bloqueado por la administración previa de JHW 007.

16. Tras 3 semanas en las que a los animales no se les aplicó ningún tratamiento, la administración de un *challenge* de anfetamina produce sensibilización locomotora, más evidente durante los primeros 10 minutos, en el grupo que recibió anfetamina durante las 3 semanas anteriores de tratamiento, en comparación con el grupo que había recibido solución inocua y experimentaba la droga por primera vez. Los animales que habían sido tratados con el análogo, tanto solo como combinado con la anfetamina, no muestran el efecto de sensibilización.
17. El análisis de las muestras cerebrales recogidas de la región del NAc, procesadas tanto para el método de Golgi como para microscopía electrónica, indican que el pretratamiento con JHW 007 previene de algunas de las neuroadaptaciones asociadas al proceso de sensibilización en las MSN como son el incremento en el árbol dendrítico, en la longitud de las dendritas, un aumento en la densidad de las espinas y en la cantidad de sinapsis asimétricas.

Referencias

Ackerman JM, White FJ (1992). Decreased activity of rat A10 dopamine neurons following withdrawal from repeated cocaine. *Eur J Pharmacol* **218**(1): 171-173.

Acquas E, Di Chiara G (1992). Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. *J Neurochem* **58**(5): 1620-1625.

Acri JB, Seidleck B, Witkin JM (1993). Effects of dopamine uptake inhibitors on behavioral and toxic effects of cocaine. *Problems of Drug Dependence: Proceedings of the 55th Annual Scientific Meeting, The College on Problems of Drug Dependence NIDA Monograph* **141**.

Agoston GE, Wu JH, Izenwasser S, George C, Katz J, Kline RH, *et al* (1997). Novel N-substituted 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]tropane analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *J Med Chem* **40**(26): 4329-4339.

Ahmed SH, Koob GF (2004). Changes in response to a dopamine receptor antagonist in rats with escalating cocaine intake. *Psychopharmacology (Berl)* **172**(4): 450-454.

Alburges ME, Narang N, Wamsley JK (1993). Alterations in the dopaminergic receptor system after chronic administration of cocaine. *Synapse* **14**(4): 314-323.

Ameri A (1999). The effects of cannabinoids on the brain. *Prog Neurobiol* **58**(4): 315-348.

Anagnostaras SG, Robinson TE (1996). Sensitization to the psychomotor stimulant effects of amphetamine: modulation by associative learning. *Behav Neurosci* **110**(6): 1397-1414.

Anderson AL, Reid MS, Li SH, Holmes T, Shemanski L, Slee A, *et al* (2009). Modafinil for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **104**(1-2): 133-139.

Arnold JC (2005). The role of endocannabinoid transmission in cocaine addiction. *Pharmacol Biochem Behav* **81**(2): 396-406.

- Arria AM, Wish ED (2006). Nonmedical use of prescription stimulants among students. *Pediatr Ann* **35**(8): 565-571.
- Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Tang XC, Toda S, *et al* (2003a). Neuroadaptations in cystine-glutamate exchange underlie cocaine relapse. *Nat Neurosci* **6**(7): 743-749.
- Baker DA, McFarland K, Lake RW, Shen H, Toda S, Kalivas PW (2003b). N-acetyl cysteine-induced blockade of cocaine-induced reinstatement. *Ann N Y Acad Sci* **1003**: 349-351.
- Baker JR, Jatlow P, McCance-Katz EF (2007). Disulfiram effects on responses to intravenous cocaine administration. *Drug Alcohol Depend* **87**(2-3): 202-209.
- Baker LE, Riddle EE, Saunders RB, Appel JB (1993). The role of monoamine uptake in the discriminative stimulus effects of cocaine and related compounds. *Behav Pharmacol* **4**(1): 69-79.
- Ballon JS, Feifel D (2006). A systematic review of modafinil: Potential clinical uses and mechanisms of action. *J Clin Psychiatry* **67**(4): 554-566.
- Bastuji H, Jouvet M (1988). Successful treatment of idiopathic hypersomnia and narcolepsy with modafinil. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **12**(5): 695-700.
- Baumann MH, Char GU, De Costa BR, Rice KC, Rothman RB (1994). GBR12909 attenuates cocaine-induced activation of mesolimbic dopamine neurons in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **271**(3): 1216-1222.
- Beardsley PM, Dance ME, Balster RL, Munzar P (2002). Evaluation of the reinforcing effects of the cannabinoid CB1 receptor antagonist, SR141716, in rhesus monkeys. *Eur J Pharmacol* **435**(2-3): 209-216.
- Beresford TP, Clapp L, Martin B, Wiberg JL, Alfors J, Beresford HF (2005). Aripiprazole in schizophrenia with cocaine dependence: a pilot study. *J Clin Psychopharmacol* **25**(4): 363-366.
- Berger SP, Winhusen TM, Somoza EC, Harrer JM, Mezinskis JP, Leiderman DB, *et al* (2005). A medication screening trial evaluation of reserpine, gabapentin and lamotrigine pharmacotherapy of cocaine dependence. *Addiction* **100 Suppl 1**: 58-67.

- Bergman J (1990). Psychomotor stimulant effects of the stereoisomers of chlorpheniramine. *Psychopharmacology (Berl)* **100**(1): 132-134.
- Bergman J, Madras BK, Johnson SE, Spealman RD (1989). Effects of cocaine and related drugs in nonhuman primates. III. Self-administration by squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **251**(1): 150-155.
- Bergman J, Spealman RD (1986). Some behavioral effects of histamine H1 antagonists in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **239**(1): 104-110.
- Bernard V, Dumartin B, Lamy E, Bloch B (1993). Fos immunoreactivity after stimulation or inhibition of muscarinic receptors indicates anatomical specificity for cholinergic control of striatal efferent neurons and cortical neurons in the rat. *Eur J Neurosci* **5**(9): 1218-1225.
- Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K, *et al* (2008). The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci* **11**(7): 780-789.
- Bhattacharyya AK, Pradhan SN (1979). Behavioral interactions in cocaine-treated rats. *Life Sci* **24**(20): 1855-1860.
- Billiard M, Besset A, Montplaisir J, Laffont F, Goldenberg F, Weill JS, *et al* (1994). Modafinil: a double-blind multicentric study. *Sleep* **17**(8 Suppl): S107-112.
- Bisgaard H, Larsen MA, Mazier S, Beuming T, Newman AH, Weinstein H, *et al* (2011). The binding sites for benzotropines and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Neuropharmacology* **60**(1): 182-190.
- Bjijou Y, Stinus L, Le Moal M, Cador M (1996). Evidence for selective involvement of dopamine D1 receptors of the ventral tegmental area in the behavioral sensitization induced by intra-ventral tegmental area injections of D-amphetamine. *J Pharmacol Exp Ther* **277**(2): 1177-1187.
- Boettiger CA, Kelley EA, Mitchell JM, D'Esposito M, Fields HL (2009). Now or Later? An fMRI study of the effects of endogenous opioid blockade on a decision-making network. *Pharmacol Biochem Behav* **93**(3): 291-299.

Boileau I, Assaad JM, Pihl RO, Benkelfat C, Leyton M, Diksic M, *et al* (2003). Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens. *Synapse* **49**(4): 226-231.

Boileau I, Dagher A, Leyton M, Welfeld K, Booij L, Diksic M, *et al* (2007). Conditioned dopamine release in humans: a positron emission tomography [11C]raclopride study with amphetamine. *J Neurosci* **27**(15): 3998-4003.

Bonasera SJ, Schenk AK, Luxenberg EJ, Tecott LH (2008). A novel method for automatic quantification of psychostimulant-evoked route-tracing stereotypy: application to *Mus musculus*. *Psychopharmacology (Berl)* **196**(4): 591-602.

Bordet R, Ridray S, Carboni S, Diaz J, Sokoloff P, Schwartz JC (1997). Induction of dopamine D3 receptor expression as a mechanism of behavioral sensitization to levodopa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(7): 3363-3367.

Bowers MS, McFarland K, Lake RW, Peterson YK, Lapish CC, Gregory ML, *et al* (2004). Activator of G protein signaling 3: a gatekeeper of cocaine sensitization and drug seeking. *Neuron* **42**(2): 269-281.

Bradberry CW (2007). Cocaine sensitization and dopamine mediation of cue effects in rodents, monkeys, and humans: areas of agreement, disagreement, and implications for addiction. *Psychopharmacology (Berl)* **191**(3): 705-717.

Broadbear JH, Winger G, Woods JH (2004). Self-administration of fentanyl, cocaine and ketamine: effects on the pituitary-adrenal axis in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **176**(3-4): 398-406.

Brodie JD, Figueroa E, Dewey SL (2003). Treating cocaine addiction: from preclinical to clinical trial experience with gamma-vinyl GABA. *Synapse* **50**(3): 261-265.

Brodie JD, Figueroa E, Laska EM, Dewey SL (2005). Safety and efficacy of gamma-vinyl GABA (GVG) for the treatment of methamphetamine and/or cocaine addiction. *Synapse* **55**(2): 122-125.

Buckley NJ, Bonner TI, Buckley CM, Brann MR (1989). Antagonist binding properties of five cloned muscarinic receptors expressed in CHO-K1 cells. *Mol Pharmacol* **35**(4): 469-476.

Campbell UC, Lac ST, Carroll ME (1999). Effects of baclofen on maintenance and reinstatement of intravenous cocaine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **143**(2): 209-214.

Campbell VC, Kopajtic TA, Newman AH, Katz JL (2005). Assessment of the influence of histaminergic actions on cocaine-like effects of 3alpha-diphenylmethoxytropine analogs. *J Pharmacol Exp Ther* **315**(2): 631-640.

Canales JJ (2005). Intermittent cortical stimulation evokes sensitization to cocaine and enduring changes in matrix and striosome neuron responsiveness. *Synapse* **57**(1): 56-60.

Canales JJ, Graybiel AM (2000). A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat Neurosci* **3**(4): 377-383.

Canales JJ, Iversen SD (1998). Behavioural topography in the striatum: differential effects of quinpirole and D-amphetamine microinjections. *Eur J Pharmacol* **362**(2-3): 111-119.

Canales JJ, Iversen SD (2000). Dynamic dopamine receptor interactions in the core and shell of nucleus accumbens differentially coordinate the expression of unconditioned motor behaviors. *Synapse* **36**(4): 297-306.

Cao J, Kulkarni SS, Husbands SM, Bowen WD, Williams W, Kopajtic T, *et al* (2003). Dual probes for the dopamine transporter and sigma1 receptors: novel piperazinyl alkyl-bis(4'-fluorophenyl)amine analogues as potential cocaine-abuse therapeutic agents. *J Med Chem* **46**(13): 2589-2598.

Carlton PL, Didamo P (1961). Augmentation of the behavioral effects of amphetamine by atropine. *J Pharmacol Exp Ther* **132**: 91-96.

Carney JM, Landrum RW, Cheng MS, Seale TW (1991). Establishment of chronic intravenous drug self-administration in the C57BL/6J mouse. *Neuroreport* **2**(8): 477-480.

Carrera MR, Ashley JA, Zhou B, Wirsching P, Koob GF, Janda KD (2000). Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(11): 6202-6206.

- Carroll KM, Nich C, Ball SA, McCance E, Rounsavile BJ (1998). Treatment of cocaine and alcohol dependence with psychotherapy and disulfiram. *Addiction* **93**(5): 713-727.
- Cervo L, Cocco A, Petrella C, Heidbreder CA (2007). Selective antagonism at dopamine D3 receptors attenuates cocaine-seeking behaviour in the rat. *Int J Neuropsychopharmacol* **10**(2): 167-181.
- Chase TD, Carrey N, Brown RE, Wilkinson M (2005). Methylphenidate regulates c-fos and fosB expression in multiple regions of the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* **156**(1): 1-12.
- Chen JC, Su HJ, Huang LI, Hsieh MM (1999). Reductions in binding and functions of D2 dopamine receptors in the rat ventral striatum during amphetamine sensitization. *Life Sci* **64**(5): 343-354.
- Chen N, Zhen J, Reith ME (2004). Mutation of Trp84 and Asp313 of the dopamine transporter reveals similar mode of binding interaction for GBR12909 and benztropine as opposed to cocaine. *J Neurochem* **89**(4): 853-864.
- Ciraulo DA, Sarid-Segal O, Knapp CM, Ciraulo AM, LoCastro J, Bloch DA, *et al* (2005). Efficacy screening trials of paroxetine, pentoxifylline, riluzole, pramipexole and venlafaxine in cocaine dependence. *Addiction* **100 Suppl 1**: 12-22.
- Cline EJ, Scheffel U, Boja JW, Carroll FI, Katz JL, Kuhar MJ (1992). Behavioral effects of novel cocaine analogs: a comparison with in vivo receptor binding potency. *J Pharmacol Exp Ther* **260**(3): 1174-1179.
- Collins SL, Levin FR, Foltin RW, Kleber HD, Evans SM (2006). Response to cocaine, alone and in combination with methylphenidate, in cocaine abusers with ADHD. *Drug Alcohol Depend* **82**(2): 158-167.
- Colpaert FC, Niemegeers CJ, Janssen PA (1979). Discriminative stimulus properties of cocaine: neuropharmacological characteristics as derived from stimulus generalization experiments. *Pharmacol Biochem Behav* **10**(4): 535-546.

- Cousins MS, Roberts DC, de Wit H (2002). GABA(B) receptor agonists for the treatment of drug addiction: a review of recent findings. *Drug Alcohol Depend* **65**(3): 209-220.
- Covington HE, 3rd, Miczek KA (2001). Repeated social-defeat stress, cocaine or morphine. Effects on behavioral sensitization and intravenous cocaine self-administration "binges". *Psychopharmacology (Berl)* **158**(4): 388-398.
- Coyle JT, Snyder SH (1969). Antiparkinsonian drugs: inhibition of dopamine uptake in the corpus striatum as a possible mechanism of action. *Science* **166**(3907): 899-901.
- Crombag HS, Gorny G, Li Y, Kolb B, Robinson TE (2005). Opposite effects of amphetamine self-administration experience on dendritic spines in the medial and orbital prefrontal cortex. *Cereb Cortex* **15**(3): 341-348.
- Crow TJ (1973). Catecholamine-containing neurones and electrical self-stimulation. A theoretical interpretation and some psychiatric implications. *Psychol Med* **3**(1): 66-73.
- Cruickshank CC, Montebello ME, Dyer KR, Quigley A, Blaszczyk J, Tomkins S, *et al* (2008). A placebo-controlled trial of mirtazapine for the management of methamphetamine withdrawal. *Drug Alcohol Rev* **27**(3): 326-333.
- Cunningham CL, Clemans JM, Fidler TL (2002). Injection timing determines whether intragastric ethanol produces conditioned place preference or aversion in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **72**(3): 659-668.
- Dackis CA (2004). Recent advances in the pharmacotherapy of cocaine dependence. *Curr Psychiatry Rep* **6**(5): 323-331.
- Dackis CA, Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, O'Brien CP (2005). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* **30**(1): 205-211.
- Dackis CA, Lynch KG, Yu E, Samaha FF, Kampman KM, Cornish JW, *et al* (2003). Modafinil and cocaine: a double-blind, placebo-controlled drug interaction study. *Drug Alcohol Depend* **70**(1): 29-37.
- Dackis CA, O'Brien CP (2001). Cocaine dependence: a disease of the brain's reward centers. *J Subst Abuse Treat* **21**(3): 111-117.

- Daglish MR, Williams TM, Wilson SJ, Taylor LG, Eap CB, Augsburger M, *et al* (2008). Brain dopamine response in human opioid addiction. *Br J Psychiatry* **193**(1): 65-72.
- Dalley JW, Fryer TD, Brichard L, Robinson ES, Theobald DE, Laane K, *et al* (2007). Nucleus accumbens D2/3 receptors predict trait impulsivity and cocaine reinforcement. *Science* **315**(5816): 1267-1270.
- Dar DE, Mayo C, Uhl GR (2005). The interaction of methylphenidate and benztropine with the dopamine transporter is different than other substrates and ligands. *Biochem Pharmacol* **70**(3): 461-469.
- De Boer T (1996). The pharmacologic profile of mirtazapine. *J Clin Psychiatry* **57 Suppl 4**: 19-25.
- De Vries TJ, Schoffelmeer AN, Binnekade R, Vanderschuren LJ (1999). Dopaminergic mechanisms mediating the incentive to seek cocaine and heroin following long-term withdrawal of IV drug self-administration. *Psychopharmacology (Berl)* **143**(3): 254-260.
- Deroche-Gamonet V, Belin D, Piazza PV (2004). Evidence for addiction-like behavior in the rat. *Science* **305**(5686): 1014-1017.
- Deroche-Gamonet V, Darnaudery M, Bruins-Slot L, Piat F, Le Moal M, Piazza PV (2002). Study of the addictive potential of modafinil in naive and cocaine-experienced rats. *Psychopharmacology (Berl)* **161**(4): 387-395.
- Desai RI, Kopajtic TA, French D, Newman AH, Katz JL (2005a). Relationship between in vivo occupancy at the dopamine transporter and behavioral effects of cocaine, GBR 12909 [1-{2-[bis-(4-fluorophenyl)methoxy]ethyl}-4-(3-phenylpropyl)piperazine], and benztropine analogs. *J Pharmacol Exp Ther* **315**(1): 397-404.
- Desai RI, Kopajtic TA, Koffarnus M, Newman AH, Katz JL (2005b). Identification of a dopamine transporter ligand that blocks the stimulant effects of cocaine. *J Neurosci* **25**(8): 1889-1893.
- Di Ciano P, Everitt BJ (2003). The GABA(B) receptor agonist baclofen attenuates cocaine- and heroin-seeking behavior by rats. *Neuropsychopharmacology* **28**(3): 510-518.

- Diana M, Pistis M, Carboni S, Gessa GL, Rossetti ZL (1993). Profound decrement of mesolimbic dopaminergic neuronal activity during ethanol withdrawal syndrome in rats: electrophysiological and biochemical evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(17): 7966-7969.
- Djouma E, Lawrence AJ (2002). The effect of chronic ethanol consumption and withdrawal on mu-opioid and dopamine D(1) and D(2) receptor density in Fawn-Hooded rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **302**(2): 551-559.
- Donovan JL, DeVane CL, Malcolm RJ, Mojsiak J, Chiang CN, Elkashef A, *et al* (2005). Modafinil influences the pharmacokinetics of intravenous cocaine in healthy cocaine-dependent volunteers. *Clin Pharmacokinet* **44**(7): 753-765.
- Dremencov E, Weizmann Y, Kinor N, Gispan-Herman I, Yadid G (2006). Modulation of dopamine transmission by 5HT_{2C} and 5HT₃ receptors: a role in the antidepressant response. *Curr Drug Targets* **7**(2): 165-175.
- Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, Kinahan PE, Grace AA, *et al* (2001). Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biol Psychiatry* **49**(2): 81-96.
- Duryee MJ, Bevins RA, Reichel CM, Murray JE, Dong Y, Thiele GM, *et al* (2009). Immune responses to methamphetamine by active immunization with peptide-based, molecular adjuvant-containing vaccines. *Vaccine* **27**(22): 2981-2988.
- El-Sayeh HG, Morganti C, Adams CE (2006). Aripiprazole for schizophrenia. Systematic review. *Br J Psychiatry* **189**: 102-108.
- Elkashef AM, Rawson RA, Anderson AL, Li SH, Holmes T, Smith EV, *et al* (2008). Bupropion for the treatment of methamphetamine dependence. *Neuropsychopharmacology* **33**(5): 1162-1170.
- EMCDDA (2011) Informe anual. El problema de la drogodependencia en Europa., Observatorio Europeo de las Drogas y las Toxicomanías (ed).
- Erb S, Brown ZJ (2006). A role for corticotropin-releasing factor in the long-term expression of behavioral sensitization to cocaine. *Behav Brain Res* **172**(2): 360-364.

Everitt BJ, Belin D, Economidou D, Pelloux Y, Dalley JW, Robbins TW (2008). Neural mechanisms underlying the vulnerability to develop compulsive drug-seeking habits and addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**(1507): 3125-3135.

Everitt BJ, Robbins TW (2005). Neural systems of reinforcement for drug addiction: from actions to habits to compulsion. *Nat Neurosci* **8**(11): 1481-1489.

Everitt BJ, Wolf ME (2002). Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *J Neurosci* **22**(9): 3312-3320.

Fadda P, Scherma M, Fresu A, Collu M, Fratta W (2003). Baclofen antagonizes nicotine-, cocaine-, and morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens of rat. *Synapse* **50**(1): 1-6.

Farfel GM, Kleven MS, Woolverton WL, Seiden LS, Perry BD (1992). Effects of repeated injections of cocaine on catecholamine receptor binding sites, dopamine transporter binding sites and behavior in rhesus monkey. *Brain Res* **578**(1-2): 235-243.

Fechtner RD, Khouri AS, Figueroa E, Ramirez M, Federico M, Dewey SL, *et al* (2006). Short-term treatment of cocaine and/or methamphetamine abuse with vigabatrin: ocular safety pilot results. *Arch Ophthalmol* **124**(9): 1257-1262.

Feltenstein MW, Altar CA, See RE (2007). Aripiprazole blocks reinstatement of cocaine seeking in an animal model of relapse. *Biol Psychiatry* **61**(5): 582-590.

Fernandez-Espejo E (2006). The neurobiology of psychostimulant addiction. *Rev Neurol* **43**(3): 147-154.

Ferragud A, Velazquez-Sanchez C, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, Merino V, Carda M, *et al* (2009). A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **207**(2): 281-289.

Ferrario CR, Robinson TE (2007). Amphetamine pretreatment accelerates the subsequent escalation of cocaine self-administration behavior. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**(5): 352-357.

Filip M, Frankowska M (2008). GABA(B) receptors in drug addiction. *Pharmacol Rep* **60**(6): 755-770.

Filip M, Przegalinski E (1997). The role of dopamine receptor subtypes in the discriminative stimulus effects of amphetamine and cocaine in rats. *Pol J Pharmacol* **49**(1): 21-30.

Fudala PJ, Iwamoto ET (1990). Conditioned aversion after delay place conditioning with amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* **35**(1): 89-92.

Galloway GP, Buscemi R, Coyle JR, Flower K, Siegrist JD, Fiske LA, *et al* (2011). A randomized, placebo-controlled trial of sustained-release dextroamphetamine for treatment of methamphetamine addiction. *Clin Pharmacol Ther* **89**(2): 276-282.

Gatch MB, Youngblood BD, Forster MJ (2003). Effects of ethanol on cocaine discrimination in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **75**(4): 837-844.

George TP, Chawarski MC, Pakes J, Carroll KM, Kosten TR, Schottenfeld RS (2000). Disulfiram versus placebo for cocaine dependence in buprenorphine-maintained subjects: a preliminary trial. *Biol Psychiatry* **47**(12): 1080-1086.

Gerasimov MR, Schiffer WK, Gardner EL, Marsteller DA, Lennon IC, Taylor SJ, *et al* (2001). GABAergic blockade of cocaine-associated cue-induced increases in nucleus accumbens dopamine. *Eur J Pharmacol* **414**(2-3): 205-209.

Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, Caron MG, Tonegawa S (2001). Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15312-15317.

Giuffrida A, Parsons LH, Kerr TM, Rodriguez de Fonseca F, Navarro M, Piomelli D (1999). Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nat Neurosci* **2**(4): 358-363.

Glowa JR, Wojnicki FH, Matecka D, Bacher JD, Mansbach RS, Balster RL (1995a). Effects of dopamine reuptake inhibitors on food- and cocaine-maintained responding: I. Dependence on unit dose of cocaine. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* **3**: 219-231.

Glowa JR, Wojnicki FH, Matecka D, Rice KC (1995b). Effects of dopamine reuptake inhibitors on food- and cocaine-maintained responding: II. Comparisons with other drugs and repeated administrations. *Experimental and Clinical Psychopharmacology* **3**: 232-239.

Goldstein RZ, Volkow ND (2002a). Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am J Psychiatry* **159**(10): 1642-1652.

Goldstein RZ, Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Depue RA, *et al* (2002b). The orbitofrontal cortex in methamphetamine addiction: involvement in fear. *Neuroreport* **13**(17): 2253-2257.

Gonzalez FA, Goldberg SR (1977). Effects of cocaine and d-amphetamine on behavior maintained under various schedules of food presentation in squirrel monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **201**(1): 33-43.

Gonzalez G, Sevarino K, Sofuoglu M, Poling J, Oliveto A, Gonsai K, *et al* (2003). Tiagabine increases cocaine-free urines in cocaine-dependent methadone-treated patients: results of a randomized pilot study. *Addiction* **98**(11): 1625-1632.

Gonzalez-Cuevas G, Aujla H, Martin-Fardon R, Lopez-Moreno JA, Navarro M, Weiss F (2007). Subchronic cannabinoid agonist (WIN 55,212-2) treatment during cocaine abstinence alters subsequent cocaine seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **32**(11): 2260-2266.

Gorelick DA (1998). The rate hypothesis and agonist substitution approaches to cocaine abuse treatment. *Adv Pharmacol* **42**: 995-997.

Gorelick DA, Kim YK, Bencherif B, Boyd SJ, Nelson R, Copersino M, *et al* (2005). Imaging brain mu-opioid receptors in abstinent cocaine users: time course and relation to cocaine craving. *Biol Psychiatry* **57**(12): 1573-1582.

Gossop M, Carroll KM (2006). Disulfiram, cocaine, and alcohol: two outcomes for the price of one? *Alcohol Alcohol* **41**(2): 119-120.

Grabowski J, Rhoades H, Schmitz J, Stotts A, Daruzska LA, Creson D, *et al* (2001). Dextroamphetamine for cocaine-dependence treatment: a double-blind randomized clinical trial. *J Clin Psychopharmacol* **21**(5): 522-526.

Grabowski J, Rhoades H, Stotts A, Cowan K, Kopecky C, Dougherty A, *et al* (2004a). Agonist-like or antagonist-like treatment for cocaine dependence with methadone for heroin dependence: two double-blind randomized clinical trials. *Neuropsychopharmacology* **29**(5): 969-981.

Grabowski J, Shearer J, Merrill J, Negus SS (2004b). Agonist-like, replacement pharmacotherapy for stimulant abuse and dependence. *Addict Behav* **29**(7): 1439-1464.

Grace RF (1997). Benztropine abuse and overdose--case report and review. *Adverse Drug React Toxicol Rev* **16**(2): 103-112.

Greco PG, Garris PA (2003). In vivo interaction of cocaine with the dopamine transporter as measured by voltammetry. *Eur J Pharmacol* **479**(1-3): 117-125.

Green AI (2005). Schizophrenia and comorbid substance use disorder: effects of antipsychotics. *J Clin Psychiatry* **66 Suppl 6**: 21-26.

Greenhill LL (2006). The science of stimulant abuse. *Pediatr Ann* **35**(8): 552-556.

Greenough WT (1984). Structural correlates of information storage in the mammalian brain: a review and hypothesis. *Trends neuroscience* **7**: 229-233.

Greenough WT, Bailey CH (1988). The anatomy of a memory: convergence of results across a diversity of tests. *Trends neuroscience* **11**: 142-147.

Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N, Schwartz JC, Sokoloff P (2001). BDNF controls dopamine D3 receptor expression and triggers behavioural sensitization. *Nature* **411**(6833): 86-89.

Hall DA, Powers JP, Gulley JM (2009). Blockade of D1 dopamine receptors in the medial prefrontal cortex attenuates amphetamine- and methamphetamine-induced locomotor activity in the rat. *Brain Res* **1300**: 51-57.

Haney M, Hart CL, Foltin RW (2006). Effects of baclofen on cocaine self-administration: opioid- and nonopioid-dependent volunteers. *Neuropsychopharmacology* **31**(8): 1814-1821.

Harland RD, Gauvin DV, Michaelis RC, Carney JM, Seale TW, Holloway FA (1989). Behavioral interaction between cocaine and caffeine: a drug discrimination analysis in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **32**(4): 1017-1023.

Hart CL, Jatlow P, Sevarino KA, McCance-Katz EF (2000). Comparison of intravenous cocaethylene and cocaine in humans. *Psychopharmacology (Berl)* **149**(2): 153-162.

Hawker MJ, Astbury NJ (2008). The ocular side effects of vigabatrin (Sabril): information and guidance for screening. *Eye (Lond)* **22**(9): 1097-1098.

Heinz A, Siessmeier T, Wrase J, Hermann D, Klein S, Grusser SM, *et al* (2004). Correlation between dopamine D(2) receptors in the ventral striatum and central processing of alcohol cues and craving. *Am J Psychiatry* **161**(10): 1783-1789.

Heinzerling KG, Swanson AN, Kim S, Cederblom L, Moe A, Ling W, *et al* (2010). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for the treatment of methamphetamine dependence. *Drug Alcohol Depend* **109**(1-3): 20-29.

Henry DJ, Hu XT, White FJ (1998). Adaptations in the mesoaccumbens dopamine system resulting from repeated administration of dopamine D1 and D2 receptor-selective agonists: relevance to cocaine sensitization. *Psychopharmacology (Berl)* **140**(2): 233-242.

Henry DJ, White FJ (1995). The persistence of behavioral sensitization to cocaine parallels enhanced inhibition of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci* **15**(9): 6287-6299.

Herling S, Downs DA, Woods JH (1979). Cocaine, d-amphetamine, and pentobarbital effects on responding maintained by food or cocaine in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **64**(3): 261-269.

Hernandez G, Hamdani S, Rajabi H, Conover K, Stewart J, Arvanitogiannis A, *et al* (2006). Prolonged rewarding stimulation of the rat medial forebrain bundle: neurochemical and behavioral consequences. *Behav Neurosci* **120**(4): 888-904.

Higgins ST, Budney AJ, Bickel WK, Hughes JR, Foerg F (1993). Disulfiram therapy in patients abusing cocaine and alcohol. *Am J Psychiatry* **150**(4): 675-676.

Hildebrand BE, Nomikos GG, Hertel P, Schilstrom B, Svensson TH (1998). Reduced dopamine output in the nucleus accumbens but not in the medial prefrontal cortex in rats displaying a mecamylamine-precipitated nicotine withdrawal syndrome. *Brain Res* **779**(1-2): 214-225.

Hiranita T, Soto PL, Newman AH, Katz JL (2009). Assessment of reinforcing effects of benztropine analogs and their effects on cocaine self-administration in rats: comparisons with monoamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* **329**(2): 677-686.

Hodos W (1961). Progressive ratio as a measure of reward strength. *Science* **134**(3483): 943-944.

Holtzman SG (1990). Discriminative stimulus effects of drugs: Relationship to potential for abuse. *Modern methods in pharmacology, testing and evaluation of drugs of abuse* Wiley Liss Inc: Wilmington, DE. Vol 6, pp 193-210.

Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, Iadarola MJ, Nakabeppu Y, *et al* (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* **13**(5): 1235-1244.

Horger BA, Giles MK, Schenk S (1992). Preexposure to amphetamine and nicotine predisposes rats to self-administer a low dose of cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* **107**(2-3): 271-276.

Horger BA, Shelton K, Schenk S (1990). Preexposure sensitizes rats to the rewarding effects of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* **37**(4): 707-711.

Howell LL, Byrd LD (1995). Serotonergic modulation of the behavioral effects of cocaine in the squirrel monkey. *J Pharmacol Exp Ther* **275**(3): 1551-1559.

Howell LL, Czoty PW, Kuhar MJ, Carrol FI (2000). Comparative behavioral pharmacology of cocaine and the selective dopamine uptake inhibitor RTI-113 in the squirrel monkey. *J Pharmacol Exp Ther* **292**(2): 521-529.

Huang X, Zhan CG (2007). How dopamine transporter interacts with dopamine: Insights from molecular modeling and simulation. *Biophysical Journal* **93**(30): 3627-3639.

- Husbands SM, Izenwasser S, Kopajtic T, Bowen WD, Vilner BJ, Katz JL, *et al* (1999). Structure-activity relationships at the monoamine transporters and sigma receptors for a novel series of 9-[3-(cis-3, 5-dimethyl-1-piperazinyl)propyl]carbazole (rimcazole) analogues. *J Med Chem* **42**(21): 4446-4455.
- Imperato A, Mele A, Scrocco MG, Puglisi-Allegra S (1992). Chronic cocaine alters limbic extracellular dopamine. Neurochemical basis for addiction. *Eur J Pharmacol* **212**(2-3): 299-300.
- Indarte M, Madura JD, Surratt CK (2008). Dopamine transporter comparative molecular modeling and binding site prediction using the LeuT(Aa) leucine transporter as a template. *Proteins* **70**(3): 1033-1046.
- Iversen L (2000). Neurotransmitter transporters: fruitful targets for CNS drug discovery. *Mol Psychiatry* **5**(4): 357-362.
- Izenwasser S, Thompson-Montgomery D, Deben SE, Chowdhury IN, Werling LL (1998). Modulation of amphetamine-stimulated (transporter mediated) dopamine release in vitro by sigma2 receptor agonists and antagonists. *Eur J Pharmacol* **346**(2-3): 189-196.
- Jasinski DR (2000). An evaluation of the abuse potential of modafinil using methylphenidate as a reference. *J Psychopharmacol* **14**(1): 53-60.
- Jasinski DR, Kovacevic-Ristanovic R (2000). Evaluation of the abuse liability of modafinil and other drugs for excessive daytime sleepiness associated with narcolepsy. *Clin Neuropharmacol* **23**(3): 149-156.
- Johanson CE, Balster RL, Bonese K (1976). Self-administration of psychomotor stimulant drugs: the effects of unlimited access. *Pharmacol Biochem Behav* **4**(1): 45-51.
- Johnson BA (2005). Recent advances in the development of treatments for alcohol and cocaine dependence: focus on topiramate and other modulators of GABA or glutamate function. *CNS Drugs* **19**(10): 873-896.
- Johnson BA, Roache JD, Ait-Daoud N, Javors MA, Harrison JM, Elkashef A, *et al* (2006). A preliminary randomized, double-blind, placebo-controlled study of the safety and efficacy of ondansetron in the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **84**(3): 256-263.

Kahn R, Biswas K, Childress AR, Shoptaw S, Fudala PJ, Gorgon L, *et al* (2009). Multi-center trial of baclofen for abstinence initiation in severe cocaine-dependent individuals. *Drug Alcohol Depend* **103**(1-2): 59-64.

Kalechstein AD, De La Garza R, 2nd, Newton TF (2010). Modafinil administration improves working memory in methamphetamine-dependent individuals who demonstrate baseline impairment. *Am J Addict* **19**(4): 340-344.

Kalivas PW (2004). Glutamate systems in cocaine addiction. *Curr Opin Pharmacol* **4**(1): 23-29.

Kalivas PW, Duffy P (1998). Repeated cocaine administration alters extracellular glutamate in the ventral tegmental area. *J Neurochem* **70**(4): 1497-1502.

Kalivas PW, Stewart J (1991). Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Brain Res Rev* **16**(3): 223-244.

Kalivas PW, Volkow N, Seamans J (2005a). Unmanageable motivation in addiction: a pathology in prefrontal-accumbens glutamate transmission. *Neuron* **45**(5): 647-650.

Kalivas PW, Volkow ND (2005b). The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* **162**(8): 1403-1413.

Kampman KM (2009). New medications for the treatment of cocaine dependence. *Ann Ist Super Sanita* **45**(2): 109-115.

Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Dackis C, Sparkman T, Weigley C, *et al* (2004). A pilot trial of topiramate for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **75**(3): 233-240.

Kampman KM, Pettinati H, Lynch KG, Sparkman T, O'Brien CP (2003). A pilot trial of olanzapine for the treatment of cocaine dependence. *Drug Alcohol Depend* **70**(3): 265-273.

Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S, *et al* (2008). New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol* **11**(3): 425-438.

Katz JL (1989). Drugs as reinforcers: Pharmacological and behavioral factors. In: Lieberman JM, Cooper SJ (eds). *The Neuropharmacological Basis of Reward*. Clarendon Press: Oxford, pp 164-213.

Katz JL, Agoston GE, Alling KL, Kline RH, Forster MJ, Woolverton WL, *et al* (2001). Dopamine transporter binding without cocaine-like behavioral effects: synthesis and evaluation of benztropine analogs alone and in combination with cocaine in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* **154**(4): 362-374.

Katz JL, Izenwasser S, Kline RH, Allen AC, Newman AH (1999). Novel 3alpha-diphenylmethoxytropane analogs: selective dopamine uptake inhibitors with behavioral effects distinct from those of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **288**(1): 302-315.

Katz JL, Izenwasser S, Terry P (2000). Relationships among dopamine transporter affinities and cocaine-like discriminative-stimulus effects. *Psychopharmacology (Berl)* **148**(1): 90-98.

Katz JL, Kopajtic TA, Agoston GE, Newman AH (2004). Effects of N-substituted analogs of benztropine: diminished cocaine-like effects in dopamine transporter ligands. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(2): 650-660.

Katz JL, Libby TA, Kopajtic T, Husbands SM, Newman AH (2003). Behavioral effects of rimcazole analogues alone and in combination with cocaine. *Eur J Pharmacol* **468**(2): 109-119.

Katz JL, Newman AH, Izenwasser S (1997). Relations between heterogeneity of dopamine transporter binding and function and the behavioral pharmacology of cocaine. *Pharmacol Biochem Behav* **57**(3): 505-512.

Kelley AE (1999). Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors. *Ann N Y Acad Sci* **877**: 71-90.

Kelz MB, Chen J, Carlezon WA, Jr., Whisler K, Gilden L, Beckmann AM, *et al* (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**(6750): 272-276.

Kim Y, Teylan MA, Baron M, Sands A, Nairn AC, Greengard P (2009). Methylphenidate-induced dendritic spine formation and DeltaFosB expression in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(8): 2915-2920.

Kleven MS, Koek W (1998). Discriminative stimulus properties of cocaine: enhancement by monoamine reuptake blockers. *J Pharmacol Exp Ther* **284**(3): 1015-1025.

Kline RH, Izenwasser S, Katz JL, Joseph DB, Bowen WD, Newman AH (1997). 3'-Chloro-3 alpha-(diphenylmethoxy)tropane but not 4'-chloro-3 alpha-(diphenylmethoxy)tropane produces a cocaine-like behavioral profile. *J Med Chem* **40**(6): 851-857.

Kongsakon R, Papadopoulos KI, Saguansiritham R (2005). Mirtazapine in amphetamine detoxification: a placebo-controlled pilot study. *Int Clin Psychopharmacol* **20**(5): 253-256.

Koob GF (1992). Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci* **13**(5): 177-184.

Koob GF (2000). Neurobiology of addiction. Toward the development of new therapies. *Ann N Y Acad Sci* **909**: 170-185.

Koob GF (2004). Allostatic view of motivation: implications for psychopathology. *Nebr Symp Motiv* **50**: 1-18.

Koob GF (2009). Neurobiological substrates for the dark side of compulsivity in addiction. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 18-31.

Koob GF, Ahmed SH, Boutrel B, Chen SA, Kenny PJ, Markou A, *et al* (2004). Neurobiological mechanisms in the transition from drug use to drug dependence. *Neurosci Biobehav Rev* **27**(8): 739-749.

Koob GF, Bloom FE (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* **242**(4879): 715-723.

Koob GF, Le HT, Creese I (1987). The D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. *Neurosci Lett* **79**(3): 315-320.

Koob GF, Le Moal M (1997). Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. *Science* **278**(5335): 52-58.

Koob GF, Le Moal M (2001). Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. *Neuropsychopharmacology* **24**(2): 97-129.

- Koob GF, Volkow ND (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology* **35**(1): 217-238.
- Kopajtic TA, Liu Y, Surratt CK, Donovan DM, Newman AH, Katz JL (2010). Dopamine transporter-dependent and -independent striatal binding of the benztropine analog JHW 007, a cocaine antagonist with low abuse liability. *J Pharmacol Exp Ther* **335**(3): 703-714.
- Kornetsky C, Esposito RU (1979). Euphorigenic drugs: effects on the reward pathways of the brain. *Fed Proc* **38**(11): 2473-2476.
- Kosten T, Owens SM (2005). Immunotherapy for the treatment of drug abuse. *Pharmacol Ther* **108**(1): 76-85.
- Kosten TR, Biegel D (2002). Therapeutic vaccines for substance dependence. *Expert Rev Vaccines* **1**(3): 363-371.
- Krystal JH, Petrakis IL, Krupitsky E, Schutz C, Trevisan L, D'Souza DC (2003). NMDA receptor antagonism and the ethanol intoxication signal: from alcoholism risk to pharmacotherapy. *Ann N Y Acad Sci* **1003**: 176-184.
- Krystal JH, Staley J, Mason G, Petrakis IL, Kaufman J, Harris RA, *et al* (2006). Gamma-aminobutyric acid type A receptors and alcoholism: intoxication, dependence, vulnerability, and treatment. *Arch Gen Psychiatry* **63**(9): 957-968.
- Kuczenski R, Segal DS (1992). Differential effects of amphetamine and dopamine uptake blockers (cocaine, nomifensine) on caudate and accumbens dialysate dopamine and 3-methoxytyramine. *J Pharmacol Exp Ther* **262**(3): 1085-1094.
- Kuhar MJ, Ritz MC, Boja JW (1991). The dopamine hypothesis of the reinforcing properties of cocaine. *Trends Neurosci* **14**(7): 299-302.
- Kulkarni SS, Grundt P, Kopajtic T, Katz JL, Newman AH (2004). Structure-activity relationships at monoamine transporters for a series of N-substituted 3alpha-(bis[4-fluorophenyl]methoxy)tropanes: comparative molecular field analysis, synthesis, and pharmacological evaluation. *J Med Chem* **47**(13): 3388-3398.

Kulkarni SS, Kopajtic TA, Katz JL, Newman AH (2006). Comparative structure-activity relationships of benztropine analogues at the dopamine transporter and histamine H(1) receptors. *Bioorg Med Chem* **14**(11): 3625-3634.

Kushner SA, Dewey SL, Kornetsky C (1999). The irreversible gamma-aminobutyric acid (GABA) transaminase inhibitor gamma-vinyl-GABA blocks cocaine self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **290**(2): 797-802.

Laffont F, Mayer G, Minz M (1994). Modafinil in diurnal sleepiness. A study of 123 patients. *Sleep* **17**(8 Suppl): S113-115.

LaRowe SD, Mardikian P, Malcolm R, Myrick H, Kalivas P, McFarland K, *et al* (2006). Safety and tolerability of N-acetylcysteine in cocaine-dependent individuals. *Am J Addict* **15**(1): 105-110.

Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (2009). Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiol Rev* **89**(4): 1379-1412.

Le Moal M, Koob GF (2007). Drug addiction: pathways to the disease and pathophysiological perspectives. *Eur Neuropsychopharmacol* **17**(6-7): 377-393.

Leith NJ, Kuczenski R (1982). Two dissociable components of behavioral sensitization following repeated amphetamine administration. *Psychopharmacology (Berl)* **76**(4): 310-315.

Lett BT (1989). Repeated exposures intensify rather than diminish the rewarding effects of amphetamine, morphine, and cocaine. *Psychopharmacology (Berl)* **98**(3): 357-362.

Levin FR, Evans SM, Brooks DJ, Garawi F (2007). Treatment of cocaine dependent treatment seekers with adult ADHD: double-blind comparison of methylphenidate and placebo. *Drug Alcohol Depend* **87**(1): 20-29.

Lewis BL, O'Donnell P (2000). Ventral tegmental area afferents to the prefrontal cortex maintain membrane potential 'up' states in pyramidal neurons via D(1) dopamine receptors. *Cereb Cortex* **10**(12): 1168-1175.

Li SM, Newman AH, Katz JL (2005). Place conditioning and locomotor effects of N-substituted, 4',4''-difluorobenzotropine analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **313**(3): 1223-1230.

Li Y, White FJ, Wolf ME (2000). Pharmacological reversal of behavioral and cellular indices of cocaine sensitization in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3): 175-183.

Lingford-Hughes A, Watson B, Kalk N, Reid A (2010). Neuropharmacology of addiction and how it informs treatment. *Br Med Bull* **96**: 93-110.

Lograno DE, Matteo F, Trabucchi M, Govoni S, Cagiano R, Lacomba C, *et al* (1993). Effects of chronic ethanol intake at a low dose on the rat brain dopaminergic system. *Alcohol* **10**(1): 45-49.

Loland CJ, Desai RI, Zou MF, Cao J, Grundt P, Gerstbrein K, *et al* (2008). Relationship between conformational changes in the dopamine transporter and cocaine-like subjective effects of uptake inhibitors. *Mol Pharmacol* **73**(3): 813-823.

Loland CJ, Norregaard L, Litman T, Gether U (2002). Generation of an activating Zn(2+) switch in the dopamine transporter: mutation of an intracellular tyrosine constitutively alters the conformational equilibrium of the transport cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(3): 1683-1688.

Longo M, Wickes W, Smout M, Harrison S, Cahill S, White JM (2010). Randomized controlled trial of dexamphetamine maintenance for the treatment of methamphetamine dependence. *Addiction* **105**(1): 146-154.

Lott DC, Kim SJ, Cook EH, Jr., de Wit H (2005). Dopamine transporter gene associated with diminished subjective response to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* **30**(3): 602-609.

Malcolm R, Swayngim K, Donovan JL, DeVane CL, Elkashef A, Chiang N, *et al* (2006). Modafinil and cocaine interactions. *Am J Drug Alcohol Abuse* **32**(4): 577-587.

Maldonado R, Valverde O, Berrendero F (2006). Involvement of the endocannabinoid system in drug addiction. *Trends Neurosci* **29**(4): 225-232.

Mardikian PN, LaRowe SD, Hedden S, Kalivas PW, Malcolm RJ (2007). An open-label trial of N-acetylcysteine for the treatment of cocaine dependence: a pilot study. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **31**(2): 389-394.

- Martelle JL, Claytor R, Ross JT, Reboussin BA, Newman AH, Nader MA (2007). Effects of two novel D3-selective compounds, NGB 2904 [N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)-9H-fluorene-2-carboxamide] and CJB 090 [N-(4-(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)butyl)-4-(pyridin-2-yl)benzamide], on the reinforcing and discriminative stimulus effects of cocaine in rhesus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **321**(2): 573-582.
- Martin-Fardon R, Maurice T, Aujla H, Bowen WD, Weiss F (2007). Differential effects of sigma1 receptor blockade on self-administration and conditioned reinstatement motivated by cocaine vs natural reward. *Neuropsychopharmacology* **32**(9): 1967-1973.
- Martin-Iverson MT, Burger LY (1995). Behavioral sensitization and tolerance to cocaine and the occupation of dopamine receptors by dopamine. *Mol Neurobiol* **11**(1-3): 31-46.
- Martinez D, Broft A, Foltin RW, Slifstein M, Hwang DR, Huang Y, *et al* (2004). Cocaine dependence and d2 receptor availability in the functional subdivisions of the striatum: relationship with cocaine-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **29**(6): 1190-1202.
- Matsumoto RR, Liu Y, Lerner M, Howard EW, Brackett DJ (2003). Sigma receptors: potential medications development target for anti-cocaine agents. *Eur J Pharmacol* **469**(1-3): 1-12.
- Mattick RP, Breen C, Kimber J, Davoli M (2009). Methadone maintenance therapy versus no opioid replacement therapy for opioid dependence. *Cochrane Database Syst Rev*(3): CD002209.
- Mattson BJ, Koya E, Simmons DE, Mitchell TB, Berkow A, Crombag HS, *et al* (2008). Context-specific sensitization of cocaine-induced locomotor activity and associated neuronal ensembles in rat nucleus accumbens. *Eur J Neurosci* **27**(1): 202-212.
- May T, Juilfs F, Wolffgramm J (1998). Long-lasting effects of chronic mu-opioid intake on the signal transmission via dopamine D1 receptors in the limbic forebrain of drug deprived rats. *Neuropharmacology* **37**(8): 997-1006.
- McClung CA, Nestler EJ (2003). Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nat Neurosci* **6**(11): 1208-1215.

- McKearney JW (1982). Effects of dopamine uptake inhibitors on schedule-controlled behavior in the squirrel monkey. *Psychopharmacology (Berl)* **78**(4): 377-379.
- McMillan DE, Hardwick WC, Li M, Gunnell MG, Carroll FI, Abraham P, *et al* (2004). Effects of murine-derived anti-methamphetamine monoclonal antibodies on (+)-methamphetamine self-administration in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **309**(3): 1248-1255.
- Meredith GE, Baldo BA, Andrezjewski ME, Kelley AE (2008). The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Struct Funct* **213**(1-2): 17-27.
- Montgomery AJ, Lingford-Hughes AR, Egerton A, Nutt DJ, Grasby PM (2007). The effect of nicotine on striatal dopamine release in man: A [¹¹C]raclopride PET study. *Synapse* **61**(8): 637-645.
- Mooney ME, Schmitz JM, Moeller FG, Grabowski J (2007). Safety, tolerability and efficacy of levodopa-carbidopa treatment for cocaine dependence: two double-blind, randomized, clinical trials. *Drug Alcohol Depend* **88**(2-3): 214-223.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992). Dynamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum. *J Neurosci* **12**(7): 2609-2622.
- Morgan D, Grant KA, Gage HD, Mach RH, Kaplan JR, Prioleau O, *et al* (2002). Social dominance in monkeys: dopamine D2 receptors and cocaine self-administration. *Nat Neurosci* **5**(2): 169-174.
- Morshedi MM, Rademacher DJ, Meredith GE (2009). Increased synapses in the medial prefrontal cortex are associated with repeated amphetamine administration. *Synapse* **63**(2): 126-135.
- Muller CP, Carey RJ, Wilkisz M, Schwenzner S, Jocham G, Huston JP, *et al* (2008). Acute anxiolytic effects of cocaine: the role of test latency and activity phase. *Pharmacol Biochem Behav* **89**(2): 218-226.
- Mumford GK, Holtzman SG (1991). Qualitative differences in the discriminative stimulus effects of low and high doses of caffeine in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* **258**(3): 857-865.

Nader MA, Czoty PW, Gould RW, Riddick NV (2008). Positron emission tomography imaging studies of dopamine receptors in primate models of addiction. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **363**(1507): 3223-3232.

Nader MA, Morgan D, Gage HD, Nader SH, Calhoun TL, Buchheimer N, *et al* (2006). PET imaging of dopamine D2 receptors during chronic cocaine self-administration in monkeys. *Nat Neurosci* **9**(8): 1050-1056.

Narendran R, Martinez D (2008). Cocaine abuse and sensitization of striatal dopamine transmission: a critical review of the preclinical and clinical imaging literature. *Synapse* **62**(11): 851-869.

Navarro HA, Howard JL, Pollard GT, Carroll FI (2005). Abstract 67th Annual Meeting of the College on Problems of Drug Dependence.

Navarro HA, Howard JL, Pollard GT, Carroll FI (2009). Positive allosteric modulation of the human cannabinoid (CB) receptor by RTI-371, a selective inhibitor of the dopamine transporter. *Br J Pharmacol* **156**(7): 1178-1184.

Negus SS, Mello NK (2003). Effects of chronic d-amphetamine treatment on cocaine- and food-maintained responding under a progressive-ratio schedule in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **167**(3): 324-332.

Neisewander JL, Lucki I, McGonigle P (1994). Time-dependent changes in sensitivity to apomorphine and monoamine receptors following withdrawal from continuous cocaine administration in rats. *Synapse* **16**(1): 1-10.

Nestler EJ (2001). Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. *Science* **292**(5525): 2266-2267.

Nestler EJ (2004). Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* **25**(4): 210-218.

Newman AH, Allen AC, Izenwasser S, Katz JL (1994). Novel 3 alpha-(diphenylmethoxy)tropane analogs: potent dopamine uptake inhibitors without cocaine-like behavioral profiles. *J Med Chem* **37**(15): 2258-2261.

Newman AH, Katz J (2009). Atypical Dopamine Uptake Inhibitors that Provide Clues About Cocaine's Mechanism at the Dopamine Transporter. In: Napier S, Bingham M (eds). *Topics in Medicinal Chemistry*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. Vol 4, pp 95-129.

Newman AH, Kulkarni S (2002). Probes for the dopamine transporter: new leads toward a cocaine-abuse therapeutic--A focus on analogues of benztropine and rimcazole. *Med Res Rev* **22**(5): 429-464.

Newton TF, Ling W, Kalechstein AD, Uslaner J, Tervo K (2001). Risperidone pre-treatment reduces the euphoric effects of experimentally administered cocaine. *Psychiatry Res* **102**(3): 227-233.

Norman AB, Norman MK, Buesing WR, Tabet MR, Tsibulsky VL, Ball WJ (2009). The effect of a chimeric human/murine anti-cocaine monoclonal antibody on cocaine self-administration in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **328**(3): 873-881.

O'Brien CP, Dackis CA, Kampman K (2006). Does modafinil produce euphoria? *Am J Psychiatry* **163**(6): 1109.

Olausson P, Jentsch JD, Tronson N, Neve RL, Nestler EJ, Taylor JR (2006). DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *J Neurosci* **26**(36): 9196-9204.

Olds J, Milner P (1954). Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. *J Comp Physiol Psychol* **47**(6): 419-427.

Olmstead MC, Ouagazzal AM, Kieffer BL (2009). Mu and delta opioid receptors oppositely regulate motor impulsivity in the signaled nose poke task. *PLoS One* **4**(2): e4410.

Orson FM, Kinsey BM, Singh RA, Wu Y, Gardner T, Kosten TR (2008). Substance abuse vaccines. *Ann N Y Acad Sci* **1141**: 257-269.

Othman AA, Newman AH, Eddington ND (2007a). Applicability of the dopamine and rate hypotheses in explaining the differences in behavioral pharmacology of the chloro-benzotropine analogs: studies conducted using intracerebral microdialysis and population pharmacodynamic modeling. *J Pharmacol Exp Ther* **322**(2): 760-769.

Othman AA, Syed SA, Newman AH, Eddington ND (2007b). Transport, metabolism, and in vivo population pharmacokinetics of the chloro benztropine analogs, a class of compounds extensively evaluated in animal models of drug abuse. *J Pharmacol Exp Ther* **320**(1): 344-353.

Parsons LH, Smith AD, Justice JB, Jr. (1991). Basal extracellular dopamine is decreased in the rat nucleus accumbens during abstinence from chronic cocaine. *Synapse* **9**(1): 60-65.

Paulson PE, Camp DM, Robinson TE (1991). Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **103**(4): 480-492.

Penetar DM, Looby AR, Su Z, Lundahl LH, Eros-Sarnyai M, McNeil JF, *et al* (2006). Benzotropine pretreatment does not affect responses to acute cocaine administration in human volunteers. *Hum Psychopharmacol* **21**(8): 549-559.

Peris J, Boyson SJ, Cass WA, Curella P, Dwoskin LP, Larson G, *et al* (1990). Persistence of neurochemical changes in dopamine systems after repeated cocaine administration. *J Pharmacol Exp Ther* **253**(1): 38-44.

Petrakis IL, Carroll KM, Nich C, Gordon LT, McCance-Katz EF, Frankforter T, *et al* (2000). Disulfiram treatment for cocaine dependence in methadone-maintained opioid addicts. *Addiction* **95**(2): 219-228.

Phillips GD, Robbins TW, Everitt BJ (1994). Bilateral intra-accumbens self-administration of d-amphetamine: antagonism with intra-accumbens SCH-23390 and sulpiride. *Psychopharmacology (Berl)* **114**(3): 477-485.

Piazza PV, Deminiere JM, Le Moal M, Simon H (1989). Factors that predict individual vulnerability to amphetamine self-administration. *Science* **245**(4925): 1511-1513.

Piazza PV, Deminiere JM, le Moal M, Simon H (1990). Stress- and pharmacologically-induced behavioral sensitization increases vulnerability to acquisition of amphetamine self-administration. *Brain Res* **514**(1): 22-26.

Pierce RC, Kalivas PW (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* **25**(2): 192-216.

Pierce RC, Kumaresan V (2006). The mesolimbic dopamine system: the final common pathway for the reinforcing effect of drugs of abuse? *Neurosci Biobehav Rev* **30**(2): 215-238.

Pierre PJ, Vezina P (1997). Predisposition to self-administer amphetamine: the contribution of response to novelty and prior exposure to the drug. *Psychopharmacology (Berl)* **129**(3): 277-284.

Pierre PJ, Vezina P (1998). D1 dopamine receptor blockade prevents the facilitation of amphetamine self-administration induced by prior exposure to the drug. *Psychopharmacology (Berl)* **138**(2): 159-166.

Podet A, Lee MJ, Swann AC, Dafny N (2010). Nucleus accumbens lesions modulate the effects of methylphenidate. *Brain Res Bull* **82**(5-6): 293-301.

Poling J, Oliveto A, Petry N, Sofuoglu M, Gonsai K, Gonzalez G, *et al* (2006). Six-month trial of bupropion with contingency management for cocaine dependence in a methadone-maintained population. *Arch Gen Psychiatry* **63**(2): 219-228.

Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995). Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(26): 12304-12308.

Pothos E, Rada P, Mark GP, Hoebel BG (1991). Dopamine microdialysis in the nucleus accumbens during acute and chronic morphine, naloxone-precipitated withdrawal and clonidine treatment. *Brain Res* **566**(1-2): 348-350.

Preti A (2000). Vanoxerine National Institute on Drug Abuse. *Curr Opin Investig Drugs* **1**(2): 241-251.

Przegalinski E, Filip M, Frankowska M, Zaniewska M, Papla I (2005). Effects of CP 154,526, a CRF1 receptor antagonist, on behavioral responses to cocaine in rats. *Neuropeptides* **39**(5): 525-533.

Purves D (1994). Neural activity and the growth of the brain. Cambridge UP: Cambridge, U.K.

Raje S, Cao J, Newman AH, Gao H, Eddington ND (2003). Evaluation of the blood-brain barrier transport, population pharmacokinetics, and brain distribution of benztropine analogs and cocaine using in vitro and in vivo techniques. *J Pharmacol Exp Ther* **307**(2): 801-808.

Raje S, Cornish J, Newman AH, Cao J, Katz JL, Eddington ND (2005). Pharmacodynamic assessment of the benztropine analogues AHN-1055 and AHN-2005 using intracerebral microdialysis to evaluate brain dopamine levels and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. *Pharm Res* **22**(4): 603-612.

Raje S, Cornish J, Newman AH, Cao J, Katz JL, Eddington ND (2006). Investigation of the potential pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interaction between AHN 1-055, a potent benztropine analog used for cocaine abuse, and cocaine after dosing in rats using intracerebral microdialysis. *Biopharm Drug Dispos* **27**(5): 229-240.

Ranaldi R, Woolverton WL (2002). Self-administration of cocaine: scopolamine combinations by rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **161**(4): 442-448.

Reid MS, Casadonte P, Baker S, Sanfilipo M, Braunstein D, Hitzemann R, *et al* (2005). A placebo-controlled screening trial of olanzapine, valproate, and coenzyme Q10/L-carnitine for the treatment of cocaine dependence. *Addiction* **100 Suppl 1**: 43-57.

Reith ME, Berfield JL, Wang LC, Ferrer JV, Javitch JA (2001). The uptake inhibitors cocaine and benztropine differentially alter the conformation of the human dopamine transporter. *J Biol Chem* **276**(31): 29012-29018.

Richelson E (1981). Antidepressants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives. Raven Press: New York.

Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**(4819): 1219-1223.

Robarge MJ, Agoston GE, Izenwasser S, Kopajtic T, George C, Katz JL, *et al* (2000). Highly selective chiral N-substituted 3 α -[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]tropane analogues for the dopamine transporter: synthesis and comparative molecular field analysis. *J Med Chem* **43**(6): 1085-1093.

Robbins TW, Everitt BJ (1999). Drug addiction: bad habits add up. *Nature* **398**(6728): 567-570.

Roberts DC (1993). Self-administration of GBR 12909 on a fixed ratio and progressive ratio schedule in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **111**(2): 202-206.

Roberts DC (2005). Preclinical evidence for GABAB agonists as a pharmacotherapy for cocaine addiction. *Physiol Behav* **86**(1-2): 18-20.

Roberts DC, Phelan R, Hodges LM, Hodges MM, Bennett B, Childers S, *et al* (1999). Self-administration of cocaine analogs by rats. *Psychopharmacology (Berl)* **144**(4): 389-397.

Robertson GS, Jian M (1995). D1 and D2 dopamine receptors differentially increase Fos-like immunoreactivity in accumbal projections to the ventral pallidum and midbrain. *Neuroscience* **64**(4): 1019-1034.

Robertson MW, Leslie CA, Bennett JP, Jr. (1991). Apparent synaptic dopamine deficiency induced by withdrawal from chronic cocaine treatment. *Brain Res* **538**(2): 337-339.

Robertson SD, Matthies HJ, Galli A (2009). A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters. *Mol Neurobiol* **39**(2): 73-80.

Robinson TE, Becker JB (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* **396**(2): 157-198.

Robinson TE, Berridge KC (1993). The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* **18**(3): 247-291.

Robinson TE, Berridge KC (2003). Addiction. *Annu Rev Psychol* **54**: 25-53.

Robinson TE, Camp DM (1987). Long-lasting effects of escalating doses of d-amphetamine on brain monoamines, amphetamine-induced stereotyped behavior and spontaneous nocturnal locomotion. *Pharmacol Biochem Behav* **26**(4): 821-827.

Robinson TE, Kolb B (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* **17**(21): 8491-8497.

Robinson TE, Kolb B (1999). Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* **11**(5): 1598-1604.

Robinson TE, Kolb B (2004). Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 33-46.

Rommelspacher H, Raeder C, Kaulen P, Bruning G (1992). Adaptive changes of dopamine-D2 receptors in rat brain following ethanol withdrawal: a quantitative autoradiographic investigation. *Alcohol* **9**(5): 355-362.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Diana M, Gessa GL (1992). Alcohol withdrawal in rats is associated with a marked fall in extraneuronal dopamine. *Alcohol Clin Exp Res* **16**(3): 529-532.

Rossetti ZL, Melis F, Carboni S, Gessa GL (1991). Marked decrease of extraneuronal dopamine after alcohol withdrawal in rats: reversal by MK-801. *Eur J Pharmacol* **200**(2-3): 371-372.

Rothman RB, Baumann MH (2006a). Balance between dopamine and serotonin release modulates behavioral effects of amphetamine-type drugs. *Ann N Y Acad Sci* **1074**: 245-260.

Rothman RB, Blough BE, Baumann MH (2006b). Dual dopamine-5-HT releasers: potential treatment agents for cocaine addiction. *Trends Pharmacol Sci* **27**(12): 612-618.

Rothman RB, Grieg N, Kim A, De Costa BR, Rice KC, Carroll FI, *et al* (1992). Cocaine and GBR12909 produce equivalent motoric responses at different occupancy of the dopamine transporter. *Pharmacol Biochem Behav* **43**(4): 1135-1142.

Rothman RB, Mele A, Reid AA, Akunne HC, Greig N, Thurkauf A, *et al* (1991). GBR12909 antagonizes the ability of cocaine to elevate extracellular levels of dopamine. *Pharmacol Biochem Behav* **40**(2): 387-397.

Roy SN, Bhattacharyya AK, Pradhan S, Pradhan SN (1978). Behavioural and neurochemical effects of repeated administration of cocaine in rats. *Neuropharmacology* **17**(8): 559-564.

Rush CR, Kelly TH, Hays LR, Baker RW, Wooten AF (2002a). Acute behavioral and physiological effects of modafinil in drug abusers. *Behav Pharmacol* **13**(2): 105-115.

Rush CR, Kelly TH, Hays LR, Wooten AF (2002b). Discriminative-stimulus effects of modafinil in cocaine-trained humans. *Drug Alcohol Depend* **67**(3): 311-322.

Samanin R, Jori A, Bernasconi S, Morpugo E, Garattini S (1977). Biochemical and pharmacological studies on amineptine (S 1694) and (+)-amphetamine in the rat. *J Pharm Pharmacol* **29**(9): 555-558.

Scheckel CL, Boff E (1964). Behavioral Effects of Interacting Imipramine and Other Drugs with D-Amphetamine, Cocaine, and Tetrabenazine. *Psychopharmacologia* **5**: 198-208.

Schenk S (2002). Effects of GBR 12909, WIN 35,428 and indatraline on cocaine self-administration and cocaine seeking in rats. *Psychopharmacology (Berl)* **160**(3): 263-270.

Schmitz Y, Lee CJ, Schmauss C, Gonon F, Sulzer D (2001). Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *J Neurosci* **21**(16): 5916-5924.

Schubiner H, Saules KK, Arfken CL, Johanson CE, Schuster CR, Lockhart N, *et al* (2002). Double-blind placebo-controlled trial of methylphenidate in the treatment of adult ADHD patients with comorbid cocaine dependence. *Exp Clin Psychopharmacol* **10**(3): 286-294.

Schultz W (2001). Reward signaling by dopamine neurons. *Neuroscientist* **7**(4): 293-302.

Shearer J, Wodak A, van Beek I, Mattick RP, Lewis J (2003). Pilot randomized double blind placebo-controlled study of dexamphetamine for cocaine dependence. *Addiction* **98**(8): 1137-1141.

Shippenberg TS, Koob GF (2011). Recent advances in animal models of addiction. In: Davis KL, Charney D, Coyle JT, Nemeroff C (eds). *Psychopharmacology: the Fifth Generation of Progress*. Lippincott Williams &Wilkins: Philadelphia, USA.

Shippenberg TS, LeFevour A, Heidbreder C (1996). kappa-Opioid receptor agonists prevent sensitization to the conditioned rewarding effects of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **276**(2): 545-554.

Shoptaw S, Watson DW, Reiber C, Rawson RA, Montgomery MA, Majewska MD, *et al* (2005). Randomized controlled pilot trial of cabergoline, hydergine and levodopa/carbidopa: Los Angeles Cocaine Rapid Efficacy Screening Trial (CREST). *Addiction* **100 Suppl 1**: 78-90.

Siegel RK, Elsohly MA, Plowman T, Rury PM, Jones RT (1986). Cocaine in herbal tea. *JAMA* **255**(1): 40.

Smelson DA, Losonczy MF, Davis CW, Kaune M, Williams J, Ziedonis D (2002). Risperidone decreases craving and relapses in individuals with schizophrenia and cocaine dependence. *Can J Psychiatry* **47**(7): 671-675.

Smelson DA, Roy A, Roy M (1997). Risperidone diminishes cue-elicited craving in withdrawn cocaine-dependent patients. *Can J Psychiatry* **42**(9): 984.

Smelson DA, Williams J, Ziedonis D, Sussner BD, Losonczy MF, Engelhart C, *et al* (2004). A double-blind placebo-controlled pilot study of risperidone for decreasing cue-elicited craving in recently withdrawn cocaine dependent patients. *J Subst Abuse Treat* **27**(1): 45-49.

Smelson DA, Ziedonis D, Williams J, Losonczy MF, Steinberg ML, Kaune M (2006). The efficacy of olanzapine for decreasing cue-elicited craving in individuals with schizophrenia and cocaine dependence: a preliminary report. *J Clin Psychopharmacol* **26**(1): 9-12.

Sofuoglu M, Sewell RA (2009). Norepinephrine and stimulant addiction. *Addiction Biology* **14**(2): 119-120.

Sogaard U, Michalow J, Butler B, Lund Laursen A, Ingersen SH, Skrumsager BK, *et al* (1990). A tolerance study of single and multiple dosing of the selective dopamine uptake inhibitor GBR 12909 in healthy subjects. *Int Clin Psychopharmacol* **5**(4): 237-251.

Sokoloff P, Guillin O, Diaz J, Carroll P, Griffon N (2002). Brain-derived neurotrophic factor controls dopamine D3 receptor expression: implications for neurodevelopmental psychiatric disorders. *Neurotox Res* **4**(7-8): 671-678.

Souza-Formigoni ML, De Lucca EM, Hipolide DC, Enns SC, Oliveira MG, Nobrega JN (1999). Sensitization to ethanol's stimulant effect is associated with region-specific increases in brain D2 receptor binding. *Psychopharmacology (Berl)* **146**(3): 262-267.

Srisurapanont M, Jarusuraisin N, Kittirattanapaiboon P (2001). Treatment for amphetamine dependence and abuse. *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD003022.

Stafford D, LeSage MG, Rice KC, Glowa JR (2001). A comparison of cocaine, GBR 12909, and phentermine self-administration by rhesus monkeys on a progressive-ratio schedule. *Drug Alcohol Depend* **62**(1): 41-47.

Stead LF, Perera R, Bullen C, Mant D, Lancaster T (2008). Nicotine replacement therapy for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD000146.

Stein L (1961). Effects and interactions of imipramine, chlorpromazine, reserpine and amphetamine on self-stimulation: possible neurophysiological basis of depression. *Recent Adv Biol Psychiatry* **4**: 288-309.

Steketee JD, Kalivas PW (2011). Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacol Rev* **63**(2): 348-365.

Stewart J, Badiani A (1993). Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* **4**(4): 289-312.

Suh JJ, Pettinati HM, Kampman KM, O'Brien CP (2006). The status of disulfiram: a half of a century later. *J Clin Psychopharmacol* **26**(3): 290-302.

Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Prog Neurobiol* **75**(6): 406-433.

Sutton MA, Beninger RJ (1999). Psychopharmacology of conditioned reward: evidence for a rewarding signal at D1-like dopamine receptors. *Psychopharmacology (Berl)* **144**(2): 95-110.

Suzuki T, Fukuoka Y, Mori T, Miyatake M, Narita M (2004). Behavioral sensitization to the discriminative stimulus effects of methamphetamine in rats. *Eur J Pharmacol* **498**(1-3): 157-161.

Tanda G, Ebbs A, Newman AH, Katz JL (2005). Effects of 4'-chloro-3 alpha-(diphenylmethoxy)-tropane on mesostriatal, mesocortical, and mesolimbic dopamine transmission: comparison with effects of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2): 613-620.

Tanda G, Ebbs AL, Kopajtic TA, Elias LM, Campbell BL, Newman AH, *et al* (2007). Effects of muscarinic M1 receptor blockade on cocaine-induced elevations of brain dopamine levels and locomotor behavior in rats. *J Pharmacol Exp Ther* **321**(1): 334-344.

Tanda G, Kopajtic TA, Katz JL (2008). Cocaine-like neurochemical effects of antihistaminic medications. *J Neurochem* **106**(1): 147-157.

Tanda G, Newman AH, Ebbs AL, Tronci V, Green JL, Tallarida RJ, *et al* (2009a). Combinations of cocaine with other dopamine uptake inhibitors: assessment of additivity. *J Pharmacol Exp Ther* **330**(3): 802-809.

Tanda G, Newman AH, Katz J (2009b). Discovery of Drugs to Treat Cocaine Dependence: Behavioral and Neurochemical Effects of Atypical Dopamine Transport Inhibitors. In: Enna SJ, Williams M (eds). *Contemporary Aspects of Biomedical Research: Drug Discovery*. Advances in Pharmacology. Vol 57.

Tanda G, Pontieri FE, Di Chiara G (1997). Cannabinoid and heroin activation of mesolimbic dopamine transmission by a common mu1 opioid receptor mechanism. *Science* **276**(5321): 2048-2050.

Tella SR (1995). Effects of monoamine reuptake inhibitors on cocaine self-administration in rats. *Pharmacol Biochem Behav* **51**(4): 687-692.

Tolliver BK, Newman AH, Katz JL, Ho LB, Fox LM, Hsu K, Jr., *et al* (1999). Behavioral and neurochemical effects of the dopamine transporter ligand 4-chlorobenzotropine alone and in combination with cocaine in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* **289**(1): 110-122.

Tremblay L, Schultz W (1999). Relative reward preference in primate orbitofrontal cortex. *Nature* **398**(6729): 704-708.

Tuomisto J, Tuomisto L (1980). Effects of histamine and histamine antagonists on the uptake and release of catecholamines and 5-HT in brain synaptosomes. *Med Biol* **58**(1): 33-37.

Tzschentke TM (1998). Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog Neurobiol* **56**(6): 613-672.

Tzschentke TM (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addict Biol* **12**(3-4): 227-462.

Ukairo OT, Bondi CD, Newman AH, Kulkarni SS, Kozikowski AP, Pan S, *et al* (2005). Recognition of benztropine by the dopamine transporter (DAT) differs from that of the classical dopamine uptake inhibitors cocaine, methylphenidate, and mazindol as a function of a DAT transmembrane 1 aspartic acid residue. *J Pharmacol Exp Ther* **314**(2): 575-583.

Unterwald EM, Ho A, Rubenfeld JM, Kreek MJ (1994). Time course of the development of behavioral sensitization and dopamine receptor up-regulation during binge cocaine administration. *J Pharmacol Exp Ther* **270**(3): 1387-1396.

Unterwald EM, Kreek MJ, Cuntapay M (2001). The frequency of cocaine administration impacts cocaine-induced receptor alterations. *Brain Res* **900**(1): 103-109.

Valadez A, Schenk S (1994). Persistence of the ability of amphetamine preexposure to facilitate acquisition of cocaine self-administration. *Pharmacol Biochem Behav* **47**(1): 203-205.

Vanderschuren LJ, Everitt BJ (2004). Drug seeking becomes compulsive after prolonged cocaine self-administration. *Science* **305**(5686): 1017-1019.

Vanderschuren LJ, Kalivas PW (2000). Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* **151**(2-3): 99-120.

Vanderschuren LJ, Pierce RC (2010). Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci* **3**: 179-195.

Vasconcelos SM, Macedo DS, Lima LO, Sousa FC, Fonteles MM, Viana GS (2003). Effect of one-week ethanol treatment on monoamine levels and dopaminergic receptors in rat striatum. *Braz J Med Biol Res* **36**(4): 503-509.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, Merino V, Carda M, *et al* (2009). The dopamine uptake inhibitor 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]-tropane reduces cocaine-induced early-gene expression, locomotor activity, and conditioned reward. *Neuropsychopharmacology* **34**(12): 2497-2507.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Murga J, Carda M, Canales JJ (2010a). The high affinity dopamine uptake inhibitor, JHW 007, blocks cocaine-induced reward, locomotor stimulation and sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol* **20**(7): 501-508.

Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Renau-Piqueras J, Canales JJ (2010b). Therapeutic-like properties of a dopamine uptake inhibitor in animal models of amphetamine addiction. *Int J Neuropsychopharmacol* **14**(5): 655-665.

Vezina P (1996). D1 dopamine receptor activation is necessary for the induction of sensitization by amphetamine in the ventral tegmental area. *Journal of Neuroscience* **16**(7): 2411-2420.

Vezina P (2004). Sensitization of midbrain dopamine neuron reactivity and the self-administration of psychomotor stimulant drugs. *Neurosci Biobehav Rev* **27**(8): 827-839.

Vezina P, Giovino AA, Wise RA, Stewart J (1989). Environment-specific cross-sensitization between the locomotor activating effects of morphine and amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* **32**(2): 581-584.

Vezina P, Leyton M (2009). Conditioned cues and the expression of stimulant sensitization in animals and humans. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 160-168.

Vocci FJ, Acri J, Elkashef A (2005a). Medication development for addictive disorders: the state of the science. *Am J Psychiatry* **162**(8): 1432-1440.

Vocci FJ, Elkashef A (2005b). Pharmacotherapy and other treatments for cocaine abuse and dependence. *Curr Opin Psychiatry* **18**(3): 265-270.

Volkow N (2006) Methamphetamine: Abuse and Addiction. In *Research Report Series*, NIH (ed). Department of Health and Human Services.

Volkow ND, Chang L, Wang GJ, Fowler JS, Ding YS, Sedler M, *et al* (2001). Low level of brain dopamine D2 receptors in methamphetamine abusers: association with metabolism in the orbitofrontal cortex. *Am J Psychiatry* **158**(12): 2015-2021.

Volkow ND, Fowler JS (2000). Addiction, a disease of compulsion and drive: involvement of the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex* **10**(3): 318-325.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2002). Role of dopamine in drug reinforcement and addiction in humans: results from imaging studies. *Behav Pharmacol* **13**(5-6): 355-366.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ (2003). The addicted human brain: insights from imaging studies. *J Clin Invest* **111**(10): 1444-1451.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* **56 Suppl 1**: 3-8.

Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Swanson JM, Telang F (2007). Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications. *Arch Neurol* **64**(11): 1575-1579.

Volkow ND, Wang GJ, Telang F, Fowler JS, Logan J, Childress AR, *et al* (2006). Cocaine cues and dopamine in dorsal striatum: mechanism of craving in cocaine addiction. *J Neurosci* **26**(24): 6583-6588.

Wallace DR, Mactutus CF, Booze RM (1996). Repeated intravenous cocaine administration: locomotor activity and dopamine D2/D3 receptors. *Synapse* **23**(3): 152-163.

Walsh SL, Haberny KA, Bigelow GE (2000). Modulation of intravenous cocaine effects by chronic oral cocaine in humans. *Psychopharmacology (Berl)* **150**(4): 361-373.

Wang GJ, Volkow ND, Fowler JS, Logan J, Abumrad NN, Hitzemann RJ, *et al* (1997). Dopamine D2 receptor availability in opiate-dependent subjects before and after naloxone-precipitated withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **16**(2): 174-182.

Wang YC, Hsiao S (2003). Amphetamine sensitization: nonassociative and associative components. *Behav Neurosci* **117**(5): 961-969.

Wang Z, Woolverton WL (2007). Self-administration of cocaine-antihistamine combinations: super-additive reinforcing effects. *Eur J Pharmacol* **557**(2-3): 159-160.

Wang Z, Woolverton WL (2009). Super-additive interaction of the reinforcing effects of cocaine and H1-antihistamines in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* **91**(4): 590-595.

Weil AT (1978). Coca leaf as a therapeutic agent. *Am J Drug Alcohol Abuse* **5**(1): 75-86.

Weiss F, Markou A, Lorang MT, Koob GF (1992). Basal extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens are decreased during cocaine withdrawal after unlimited-access self-administration. *Brain Res* **593**(2): 314-318.

White BP, Becker-Blease KA, Grace-Bishop K (2006). Stimulant medication use, misuse, and abuse in an undergraduate and graduate student sample. *J Am Coll Health* **54**(5): 261-268.

Williams TM, Daglish MR, Lingford-Hughes A, Taylor LG, Hammers A, Brooks DJ, *et al* (2007). Brain opioid receptor binding in early abstinence from opioid dependence: positron emission tomography study. *Br J Psychiatry* **191**: 63-69.

Williams TM, Davies SJ, Taylor LG, Daglish MR, Hammers A, Brooks DJ, *et al* (2009). Brain opioid receptor binding in early abstinence from alcohol dependence and relationship to craving: an [¹¹C]diprenorphine PET study. *Eur Neuropsychopharmacol* **19**(10): 740-748.

Wilson MC, Schuster CR (1973). The effects of stimulants and depressants on cocaine self-administration behavior in the rhesus monkey. *Psychopharmacologia* **31**(4): 291-304.

Wise RA (1978). Catecholamine theories of reward: a critical review. *Brain Res* **152**(2): 215-247.

Wise RA, Bozarth MA (1987). A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* **94**(4): 469-492.

Wolf ME (1998). The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* **54**(6): 679-720.

Woolverton WL (1987). Evaluation of the role of norepinephrine in the reinforcing effects of psychomotor stimulants in rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* **26**(4): 835-839.

Woolverton WL (1991). Discriminative stimulus effects of cocaine. *NIDA Res Monogr* **116**: 61-74.

Woolverton WL, Hecht GS, Agoston GE, Katz JL, Newman AH (2001). Further studies of the reinforcing effects of benztrapine analogs in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **154**(4): 375-382.

Woolverton WL, Rowlett JK, Wilcox KM, Paul IA, Kline RH, Newman AH, *et al* (2000). 3'- and 4'-chloro-substituted analogs of benztrapine: intravenous self-administration and in vitro radioligand binding studies in rhesus monkeys. *Psychopharmacology (Berl)* **147**(4): 426-435.

Wu JC, Bell K, Najafi A, Widmark C, Keator D, Tang C, *et al* (1997). Decreasing striatal 6-FDOPA uptake with increasing duration of cocaine withdrawal. *Neuropsychopharmacology* **17**(6): 402-409.

Xi ZX, Gilbert JG, Peng XQ, Pak AC, Li X, Gardner EL (2006). Cannabinoid CB1 receptor antagonist AM251 inhibits cocaine-primed relapse in rats: role of glutamate in the nucleus accumbens. *J Neurosci* **26**(33): 8531-8536.

Yahyavi-Firouz-Abadi N, See RE (2009). Anti-relapse medications: preclinical models for drug addiction treatment. *Pharmacol Ther* **124**(2): 235-247.

Yang XM, Gorman AL, Dunn AJ, Goeders NE (1992). Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacol Biochem Behav* **41**(3): 643-650.

Zahm DS (1999). Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Ann N Y Acad Sci* **877**: 113-128.

Zijlstra F, Booij J, van den Brink W, Franken IH (2008). Striatal dopamine D2 receptor binding and dopamine release during cue-elicited craving in recently abstinent opiate-dependent males. *Eur Neuropsychopharmacol* **18**(4): 262-270.

Zou MF, Kopajtic T, Katz JL, Newman AH (2003). Structure-activity relationship comparison of (S)-2beta-substituted 3alpha-(bis[4-fluorophenyl]methoxy)tropanes and (R)-2beta-substituted 3beta-(3,4-

dichlorophenyl)tropanes at the dopamine transporter. *J Med Chem* **46**(14): 2908-2916.

Zubrycki EM, Giordano M, Sanberg PR (1990). The effects of cocaine on multivariate locomotor behavior and defecation. *Behav Brain Res* **36**(1-2): 155-159.

Anexo

The Dopamine Uptake Inhibitor 3 α -[bis(4'-fluorophenyl)metoxy]-tropane Reduces Cocaine-Induced Early-Gene Expression, Locomotor Activity, and Conditioned Reward

Clara Velázquez-Sánchez¹, Antonio Ferragud¹, Vicente Hernández-Rabaza¹, Amparo Nácher², Virginia Merino², Miguel Cardá³, Juan Murga³ and Juan J Canales^{*,1}

¹Biopsychology and Comparative Neuroscience Group, Cavanilles Institute (ICBiBE), University of Valencia-FGUV & Red de Trastornos Adictivos-RETICS, Paterna, Valencia, Spain; ²Department of Pharmacology and Pharmaceutical Science, University of Valencia, Paterna, Valencia, Spain; ³Department of Organic and Inorganic Chemistry, University Jaime I, Castellón, Spain

Benzotropine (BZT) analogs, a family of high-affinity dopamine transporter ligands, are molecules that exhibit pharmacological and behavioral characteristics predictive of significant therapeutic potential in cocaine addiction. Here, we examined in mice the effects of 3 α -[bis(4'-fluorophenyl)metoxy]-tropane (AHN-1055) on motor activity, conditioned place preference (CPP) and c-Fos expression in the striatum. AHN-1055 produced mild attenuation of spontaneous locomotor activity at a low dose (1 mg/kg) and weak stimulation at a higher dose (10 mg/kg). In parallel, the BZT analog significantly increased c-Fos expression in the dorsolateral caudoputamen at the high dose, whereas producing marginal decreases at low and moderate doses (1, 3 mg/kg) in both dorsal and ventral striatum. Interaction assays showed that cocaine's ability to stimulate locomotor activity was decreased by AHN-1055 treatment, but not by treatment with D-amphetamine. Such reduced ability did not result from an increase in stereotyped behavior. Another dopamine uptake inhibitor, nomifensine, decreased cocaine-induced locomotor activity but evoked by itself intense motor stereotypies. Remarkably, the BZT analog dose-dependently blocked cocaine-induced CPP without producing CPP when given alone, and blocked in conditioned mice cocaine-stimulated early-gene activation in the nucleus accumbens and dorsomedial striatum. These observations provide evidence that AHN-1055 does not behave as a classical psychomotor stimulant and that some of its properties, including attenuation of cocaine-induced striatal c-Fos expression, locomotor stimulation, and CPP, support its candidacy, and that of structurally related molecules, as possible pharmacotherapies in cocaine addiction.

Neuropsychopharmacology (2009) 34, 2497–2507; doi:10.1038/npp.2009.78; published online 15 July 2009

Keywords: cocaine; BZT derivative; AHN-1055; locomotor activity; place preference; c-Fos

INTRODUCTION

There is a growing medical need for effective medications for cocaine addiction, a relapsing disorder with major implications for the affected individuals and society. The wide array of psychological complications associated with cocaine abuse and the lack of specific pharmacotherapies for the disease has fuelled the search for novel treatments that might prevent the effects of cocaine in the brain, protect against relapse to drug seeking in abstinent addicts, or both (Dutta *et al*, 2003; Karila *et al*, 2008; Sofuoglu and Kosten, 2005; Kosten and Owens, 2005). Although actions at

noradrenergic, serotonergic, and cholinergic synapses are likely to make a contribution, accumulated evidence implicates the dopamine transporter (DAT) in the induction of the psychomotor stimulant effects of cocaine. The subjective effects of cocaine vary primarily as a function of the rate of DAT occupancy by cocaine and the speed of cocaine's delivery into the brain (Volkow *et al*, 2000; Volkow *et al*, 1996), suggesting that the pharmacokinetic/dynamic characteristics of cocaine and other psychoactive compounds that share DAT activity might be critical for their addictive properties.

Molecular models of DAT binding have shown that dopamine, cocaine, and amphetamine binding sites extensively overlap, making the design of antagonists, which do not themselves block dopamine uptake, highly troublesome (Beuming *et al*, 2008; Indarte *et al*, 2008). Nonetheless, other molecular studies suggested that differential modes of interaction with the DAT lead to specific conformational alterations of the transporter (Chen *et al*, 2004; Chen and

*Correspondence: Professor JJ Canales, Biopsychology and Comparative Neuroscience Group, 'Cavanilles' Institute (ICBiBE), University of Valencia-FGUV, Polígono de la Coma s/n, Paterna, 46980 Valencia, Spain. Tel (office): +34 963 543 768, Tel (lab): +34 963 543 457, Fax: +34 963 543 670, E-mail: juan.canales@uv.es

Received 7 March 2009; revised 10 June 2009; accepted 12 June 2009

Reith, 2007; Loland *et al*, 2008; Ukairo *et al*, 2005; Dar *et al*, 2005), partially accounting for the dissimilar effects of different DAT inhibitors. Moreover, evidence based on structure–activity relationship studies indicated that various classes of DAT ligands differ fundamentally in pharmacokinetic/dynamic properties, such that their functional activities are not predicted by their binding affinities *in vitro* at the DAT (Vaughan *et al*, 1999; Katz *et al*, 2001). Finally, several novel DAT inhibitors seemed to lack strong cocaine-like behavioral effects in animal models of addiction (Desai *et al*, 2005b; Katz *et al*, 2004). Therefore, the design of compounds with DAT activity with potential therapeutic applications is theoretically feasible, in view that the relationship among chemical structure, binding profile at the DAT and behavioral activity is not straightforward. This concept supports the rationale for agonist or replacement therapy in cocaine addiction by means of DAT interference (Grabowski *et al*, 2004; Rothman, 1990; Rothman *et al*, 2008).

N-substituted benzotropine (BZT) analogs are efficacious dopamine uptake inhibitors with pharmacological and functional characteristics that differ substantially from classical stimulants, such as cocaine. These agents have high affinity for the DAT and inhibit dopamine uptake (Agoston *et al*, 1997b; Katz *et al*, 2001). Further, BZT analogs display rates of DAT occupancy slower than that of cocaine (Desai *et al*, 2005a) and produce increases in extracellular dopamine levels over prolonged periods of time, by contrast to the sharp and transient elevations produced by cocaine (Raje *et al*, 2003; Raje *et al*, 2005; Tanda *et al*, 2005). These features complement their weak or limited capacity to induce cocaine-like behaviors, such as locomotor stimulation and conditioned place preference (CPP) (Desai *et al*, 2005b; Katz *et al*, 2004; Li *et al*, 2005), and support the claim that they might offer a lead for the design of efficacious replacement medications for cocaine addiction.

These experiments were aimed at characterizing the functional interactions between cocaine and one such BZT derivative, 3 α -[bis(4'-fluorophenyl)metoxy]-tropane (AHN-1055). We selected this compound because it shows high affinity for the DAT as well as equally effective antagonistic actions at muscarinic M1 receptors (Katz *et al*, 1999; Katz *et al*, 2004). The latter feature of the BZT analog could contribute to effectively antagonize the actions of cocaine (Carrigan and Dykstra, 2007; Tanda *et al*, 2007), although this issue remains controversial (Tanda and Katz, 2007). To determine the extent to which AHN-1055 was able to influence the stimulant and rewarding effects of cocaine, and to gain insight into its possible application as a pharmacotherapy for cocaine addiction, we studied the effects of the BZT analog, administered alone and in combination with cocaine, on c-Fos induction in the striatum, locomotor activity, stereotypy, and place conditioning.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Male Swiss OF-1 mice ($N=312$), aged 5–6 weeks and weighting 22–26 g (Charles River, Barcelona, Spain) served as subjects. Mice were housed in groups of four subjects

after arrival at the laboratories and were allowed 4–7 days to acclimatize to the animal facility before experiments began. The housing room was maintained under constant conditions of temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity ($50 \pm 5\%$) and was kept on a 12 h light–dark cycle (lights on at 0900 hours). Food and water were provided *ad libitum*. All experiments were carried out in accordance with the current European directives regulating animal experimentation (86/609/ECC) and were approved by the Ethical Committee (Faculty of Pharmacy) of the University of Valencia.

Pharmacological Treatments

AHN-1055 was synthesized as described earlier (Agoston *et al*, 1997a). Purity of the product was assessed by magnetic resonance, exceeding 98%. AHN-1055 was dissolved in 0.9% saline, sonicated for complete solubilization and injected at doses of 0, 1, 3, and 10 mg/kg *i.p.* Dose selection for the BZT analog was based on pilot experiments. Doses higher than 10 mg/kg (20 and 30 mg/kg) were lethal in some mice, when combined with cocaine and were not used in these experiments. Cocaine HCl, D-amphetamine sulfate and nomifensine (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) were dissolved in 0.9% saline and injected at doses of 15, 4, and 20 mg/kg *i.p.*, respectively. Doses for cocaine, D-amphetamine and nomifensine were selected based on preliminary dose–response locomotor activity and/or CPP assays performed in our laboratories. All compounds were prepared fresh daily and were injected at a volume of 10 ml/kg.

Behavioral Assays

Locomotor activity assays were performed in Perspex boxes ($53 \times 28 \times 15$ cm). Mice were habituated to the boxes for 20 min before treatments were administered. Two different experiments were carried out. In the first experiment, mice ($n=6-8$ per group) were distributed into four experimental groups receiving increasing doses of AHN-1055 (0, 1, 3, and 10 mg/kg *i.p.*). The distance travelled, as a measure of locomotor activity, was automatically recorded during 2 h in bins of 5 min. Mice were monitored with a video-track system with image analysis software (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France) that provided unbiased information regarding position, velocity, trajectory, and other relevant behavioral parameters. An additional experimental group was treated with cocaine (15 mg/kg *i.p.*) and locomotor activity was recorded during 1 h in bins of 5 min. This group was used for comparison purposes in the locomotor and early-gene assays, as this dose of cocaine was utilized throughout the experiments. In the second experiment, we studied the interactions of AHN-1055 (10 mg/kg *i.p.*), D-amphetamine (4 mg/kg *i.p.*), and nomifensine (20 mg/kg *i.p.*) with cocaine (15 mg/kg *i.p.*). One day before the administration of drug challenges, mice were habituated for 20 min to the same Perspex chambers used in the earlier experiment. The animals were assigned to one of six experimental conditions receiving saline, AHN-1055, D-amphetamine, or nomifensine as a pretreatment followed by cocaine or saline. To monitor the possible induction of long-term effects of the treatments (that is, locomotor sensitization and stereotypy), the drugs were administered during 5 consecutive days. The AHN-1055 pretreatment was

given 1 h before cocaine because of the lasting effects of AHN-1055 on dopamine overflow in the striatum (Raje *et al*, 2005) and locomotor activity, as evidenced in these experiments. The pretreatment with D-amphetamine was given 1 h before cocaine so as to match the protocol for AHN-1055. In our pilot studies, nomifensine seemed to induce short-lived locomotor effects compared with AHN-1055 and D-amphetamine. Thus, we administer it 10 min before cocaine challenge. Pretreatments were administered in the animal facility. Cocaine or saline were given immediately before the mice were placed in the activity chambers. Locomotor activity was monitored during 20 min, thus capturing the fast-onset boost of locomotor activity produced by cocaine treatment. On completion of the test, two trained observers blind to the experimental treatments assessed stereotyped behavior using a 10-point rating scale. Independent assessments of motor stereotypy were made on the five drug sessions. Scores were not accumulated for all sessions. Mice were observed simultaneously for 10 min and a score was agreed upon for each subject. The following behaviors were studied: stereotyped running and rearing (a repetitive pattern of route selection that differs from flexible, variable exploratory running), stereotyped sniffing (persistent head-down sniffing behavior), circling (repetitive 360° turns), compulsive checking (a pattern of repetitive short episodes of sniffing while running along the walls of the apparatus), and stereotyped head movements (uncontrollable head-bobbing movements). Distinct behavioral dimensions, including intensity (number of alternative responses emitted, as an indirect measure of flexibility), frequency (number of responses emitted per unit time), duration (time spent performing the most dominant response), and spatial distribution (degree to which behaviors are spatially confined, as a indirect measure of behavioral focus) were taken into account (Canales and Graybiel, 2000). The responses were rated from 1 to 10 for each of the four dimensions. The assessment consisted in an average of the four measures, rounding to the nearest natural number. Ratings varied from 1 to 10 according to the following parameters: 1, absent; 2, very weak-occasional; 3, weak; 4, moderate; 5, moderate-to-intense; 6, intense; 7, very intense; 8, severe; 9, very severe; and 10, extreme.

Conditioned place preference was carried out in chambers made of Perspex consisting of two equally sized compartments (20 × 18 × 25 cm) interconnected by a rectangular corridor. One of the compartments had black walls and white circles and a metal floor with small-perforated holes. The other compartment had black walls with white stripes and a metal floor with a grid-like pattern. The connecting corridor had transparent walls and a Perspex floor. The apparatus was provided with guillotine doors to allow the confinement of the mice in the compartments during drug-conditioning sessions. The place conditioning procedure consisted of three phases: preconditioning, conditioning, and postconditioning. During preconditioning, mice were habituated to the apparatus for 15 min in 2 consecutive days, the last of which (preconditioning session) was taken as baseline. The movements and location of the mice in the CPP apparatus were monitored using video tracking and software (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France) that provided measures of both time

spent in each compartment and locomotor activity, estimated as distance travelled. Mice that spent more than 70% of the time in one of the compartments during baseline ($n = 21$, 18% of the sample) were excluded from the study. Mice were assigned to eight experimental groups ($n = 10$ –14) receiving saline or AHN-1055 (1, 3, and 10 mg/kg) as a pretreatment followed by saline or cocaine (15 mg/kg) 1 h later. Conditioning was performed over 8 consecutive days, alternating drug sessions with control sessions in which mice received saline injections. During conditioning, the treatments were administered and the mice were confined individually in one of the compartments during 30 min. Treatments and compartments (circles and stripes) were counterbalanced. The postconditioning session was performed 24 h after the last-conditioning session. Mice were placed in the CPP apparatus in a drug-free state and were allowed to explore it for 15 min with the guillotine doors removed. The time spent in each of the compartments was recorded. For analysis purposes, the time spent by the mice in either compartment was summated and expressed as a percentage of the total time spent in the two target compartments. The relative change induced by the conditioning treatments in the preference for one compartment or the other (preconditioning vs postconditioning tests) was estimated as the ratio between the percentage of time spent in the drug-paired compartment and the time spent in the vehicle-paired compartment (Hernandez-Rabaza *et al*, 2008). An additional set of animals ($n = 63$) was exposed to the same pharmacological treatments and underwent conditioning but was killed after the last-conditioning session. The brains of these mice were used for c-Fos immunocytochemistry.

Immunocytochemistry and Microscopy

Mice were transcardially perfused under pentobarbital anesthesia (100 mg/kg, i.p.) with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde in phosphate buffer. Mice used for AHN-1055 dose-response assay were killed 2 h after the drug challenge and mice undergoing drug conditioning in the CPP assays were killed 30 min after last-conditioning session. Brains were removed, postfixed and cut in coronal sections (35 µm) on a cryostat. We used a single antigen immunocytochemistry against c-Fos (1:5000, Calbiochem, La Jolla, CA), as described earlier (Canales and Graybiel, 2000; Rodríguez-Alarcon *et al*, 2007). Briefly, endogenous peroxidase activity was quenched with 3% H₂O₂, and sections were treated with 5% normal goat serum and were incubated overnight with the c-Fos antibody. Sections were exposed to secondary antibody (goat anti-rabbit IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and to HRP-conjugated streptavidin (1:5000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). To reveal antigenic sites, sections were exposed to diaminobenzidine-H₂O₂ complex with nickel (NiSO₄) intensification, which produced a nuclear black reaction product. Controls were performed in which the primary antibody was omitted from the protocol. Sections were mounted with Entellan (Merck, Darmstadt, Germany) and coverslipped. High-resolution photomicrographs were taken with an optical microscope (Nikon Eclipse E800) through the nucleus accumbens (N Acc), and the medial (DMst) and lateral (DLst) sectors of the caudoputamen.

Only sections ranging from 1.10–1.35 mm anterior to bregma (Paxinos and Franklin, 2001) were considered for all regions under investigation. For the shell region of nucleus accumbens (N Acc shell) the counting frame was 0.06 mm² and was placed in the shell region using the most medial part of the anterior commissure as a vertical guide for the right side of the frame. For the nucleus accumbens core (N Acc core), DMst and DLst, the counting frame was adjusted to the contour of the anterior commissure, the lateral ventricle and the corpus callosum, respectively. The size of the counting frame for the N Acc core was 0.18–0.20 mm². For both DMst and DLst, the counting frame was 0.30–0.34 mm². Digital photomicrographs were taken after equalization using the corpus callosum as a blank and were examined with image analysis software (ImageTool, UTHSCSA). Counting frames were applied to the regions under investigation and threshold intensity was set manually within a constant range to remove background and faint stain. Positively immunolabelled cells were counted blind to the experimental treatments and results were expressed as density of c-Fos-positive cells (cells/mm²) for each of the regions studied.

Statistical Analysis

Parametric data were analyzed by ANOVA followed by Newman-Keuls (N-K) *post hoc* comparisons using the overall sampling error from the ANOVA as denominator. For the analysis of non-parametric observations, we followed the procedure of Conover and Iman (1981) involving rank transformations and ANOVA (Canales et al, 2000). Games-Howell (G-H) *post hoc* comparisons were made after ANOVA, thus preserving the principles of normal distribution and homogeneity of variances. Statistical significance was set at $\alpha = 0.05$ per experiment.

RESULTS

AHN-1055 is Unlike Cocaine in Early-Genes and Locomotor Activity Assays

To test and characterize the effects of AHN-1055 on locomotor activity and to correlate such changes with variations in striatal neuronal activation, mice received different doses of the BZT analog before being placed in the activity chambers. The results of these experiments are shown in Figure 1. To analyze the locomotor activity data, ANOVA was carried out with one between-subjects factor, treatment, with four levels (doses of AHN-1055; 0, 1, 3, and 10 mg/kg) and one within-subjects factor, time course, with 24 levels (5 min bins over 120 min of test). The results indicated a significant effect of the treatment factor ($F = 3.927$, $p = 0.024$), which was attributable to differences between the high and the low dose of AHN-1055, as revealed by *post hoc* comparisons. When the accumulated values for the session were examined, neither the values for the high dose of the BZT analog nor those for the low dose differed significantly from baseline (Figure 1b), although mean differences approached critical differences in N-K tests. When we explored the effects of the treatments across time, ANOVA indicated a significant interaction effect ($F = 1.330$, $p = 0.048$). Both the high dose and the low dose of the BZT

analog produced significant increase and decrease, respectively, from control values at several time points along the session (Figure 1a). To examine the effects of cocaine, ANOVA was calculated with a one between-subjects factor, treatment, with two levels (0 and 15 mg/kg of cocaine). Cocaine treatment increased locomotor activity relative to baseline values (the first 60 min of activity of the general control group), as revealed *post hoc* analysis ($F = 12.30$, $p < 0.0001$).

We next examined striatal c-Fos expression induced by AHN-1055 and cocaine exposure. The results indicated that the high dose of AHN-1055 increased c-Fos activation in the DLst compared with control values ($F = 7.102$, $p = 0.0006$; $p < 0.05$ by N-K test), but not in the other regions under investigation (Figure 1d and e). The low and moderate doses of AHN-1055 decreased the basal expression of c-Fos throughout, although not significantly so (Figure 1c and d). Cocaine treatment enhanced early-gene expression in the N Acc core ($F = 7.87$, $p = 0.0004$; $p < 0.05$ by N-K test), DMst ($F = 9.691$, $p < 0.0001$; $p < 0.05$ by N-K test), and DLst ($F = 7.102$, $p = 0.0006$; $p < 0.05$ by N-K test), but not in the N Acc shell ($F = 2.087$, $p = 0.1169$) (Figure 1c, d and e). Therefore, these observations show clear differences between AHN-1055 and cocaine in their ability to stimulate of c-Fos protein in the striatum.

AHN-1055 Differs from D-amphetamine and Nomifensine in the Modulation Cocaine-Induced Locomotion and Stereotypy

To gain insight into the possible modulatory effects of AHN-1055 on cocaine-stimulated motor activity, we carried out interaction assays in which AHN-1055 was given before cocaine administration. For comparison, we used a dopamine releaser, D-amphetamine, and a DAT inhibitor, nomifensine, as reference compounds. These drugs were administered before cocaine treatment, as done with AHN-1055. Figure 2 summarizes the findings. For the locomotor activity data, ANOVAs were performed with two between-subjects variables, pretreatment, with two levels (saline/AHN-1055, saline/D-amphetamine or saline/nomifensine), and posttreatment, with two levels (saline/cocaine), and two within-subjects variables, session, with five levels (5 days of treatments) and time, with four levels (four bins of 5 min each). In the AHN-1055 experiment, ANOVA revealed a significant interaction pretreatment \times posttreatment ($F = 5.602$, $p = 0.027$), indicating that the effect of cocaine depended on earlier exposure to AHN-1055 (Figure 2a and b). Exploration of this interaction effect with *post hoc* tests indicated that AHN-1055 significantly increased locomotor activity compared with baseline values ($p < 0.01$ by N-K test), and that the BZT analog significantly attenuated cocaine-induced hyperlocomotion ($p < 0.05$ by N-K test). When D-amphetamine was administered as a pretreatment, the interaction pretreatment \times posttreatment was not significant ($F = 3.252$, $p = 0.085$) (Figure 2d and e). When combined with cocaine, the effects of nomifensine were similar to those evoked by pretreatment with the BZT analog. Nomifensine stimulated locomotor activity significantly, although to a lesser extent than cocaine, and attenuated cocaine-induced hyperlocomotion (Figure 2g). The ANOVA showed a significant interaction pretreatment \times posttreatment

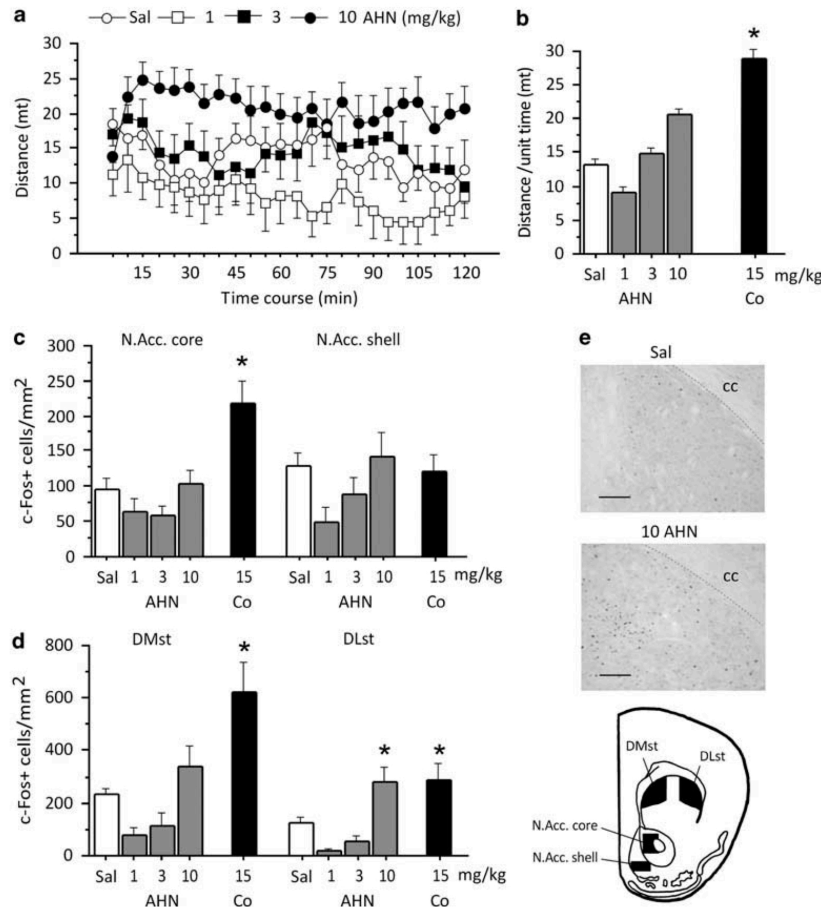


Figure 1 Effects of AHN-1055 on locomotor activity and c-Fos expression in the mouse striatum and comparison with a reference dose of cocaine. Panel in (a) shows the time course of the effects induced by AHN-1055 (0, 1, 3, and 10 mg/kg) on locomotor activity over a 2 h period. The low dose of AHN-1055 decreased, whereas the high dose increased, locomotor activity at several time points along the activity curves (a), although variations in accumulated scores (mean distance travelled per unit time) did not reach statistical significance (b). Induction of c-Fos in different striatal regions after treatment with AHN-1055 compared with the reference dose of cocaine (c, d). Cocaine stimulated c-Fos expression in both ventral and dorsal striatum, whereas the BZT analog was effective only in the DLst. Digital photomicrographs of c-Fos expression in DLst after treatment with vehicle and the high dose of AHN-1055 are shown in (e). The schematic diagram in (e) depicts the striatal regions considered for quantification. (*) indicates significant differences ($p=0.05$) from control values. cc, corpus callosum. Scale bar 100 μ m.

($F=25.732$, $p=0.0001$). However, contrary to what AHN-1055 produced, the stimulant effects of nomifensine waned with repeated exposure (Figure 2h).

It was important at that point to determine the extent to which the effects of the pretreatments on cocaine-stimulated locomotor activity were affected by the expression of dopamine-dependent stereotypies. To that effect, we quantified such behaviors during the locomotor activity assays. In all cases, we carried out ANOVA on the ranked data with a factorial variable, treatment, with four levels (combinations of pretreatments with cocaine), and a repeated measure variable, session, with five levels (5 days of treatments). The analysis of motor stereotypy revealed that pretreatment with AHN-1055 did not potentiate cocaine-induced stereotypies, which emerged progressively

with repeated cocaine administration ($F=6.572$, $p=0.002$; $p<0.05$ by G-H test) (Figure 2c). In contrast to AHN-1055, *D*-amphetamine enhanced motor stereotypies elicited by cocaine ($F=6.646$, $p=0.002$; $p<0.05$ by G-H test) (Figure 2f). Such an increase did not result from qualitative differences in the behavior exhibited by mice treated with the combination of *D*-amphetamine and cocaine. Instead, there was a generalized increment in the frequency and duration of repetitive behaviors, including mostly compulsive checking and stereotyped sniffing. We did quantify circling behavior (complete 360° turns usually followed by gnawing of the hind paws), but this behavior was not consistently induced by any of the drug treatments (data not shown). Although the effects of nomifensine resembled those of AHN-1055 in the initial sessions, similarly reducing

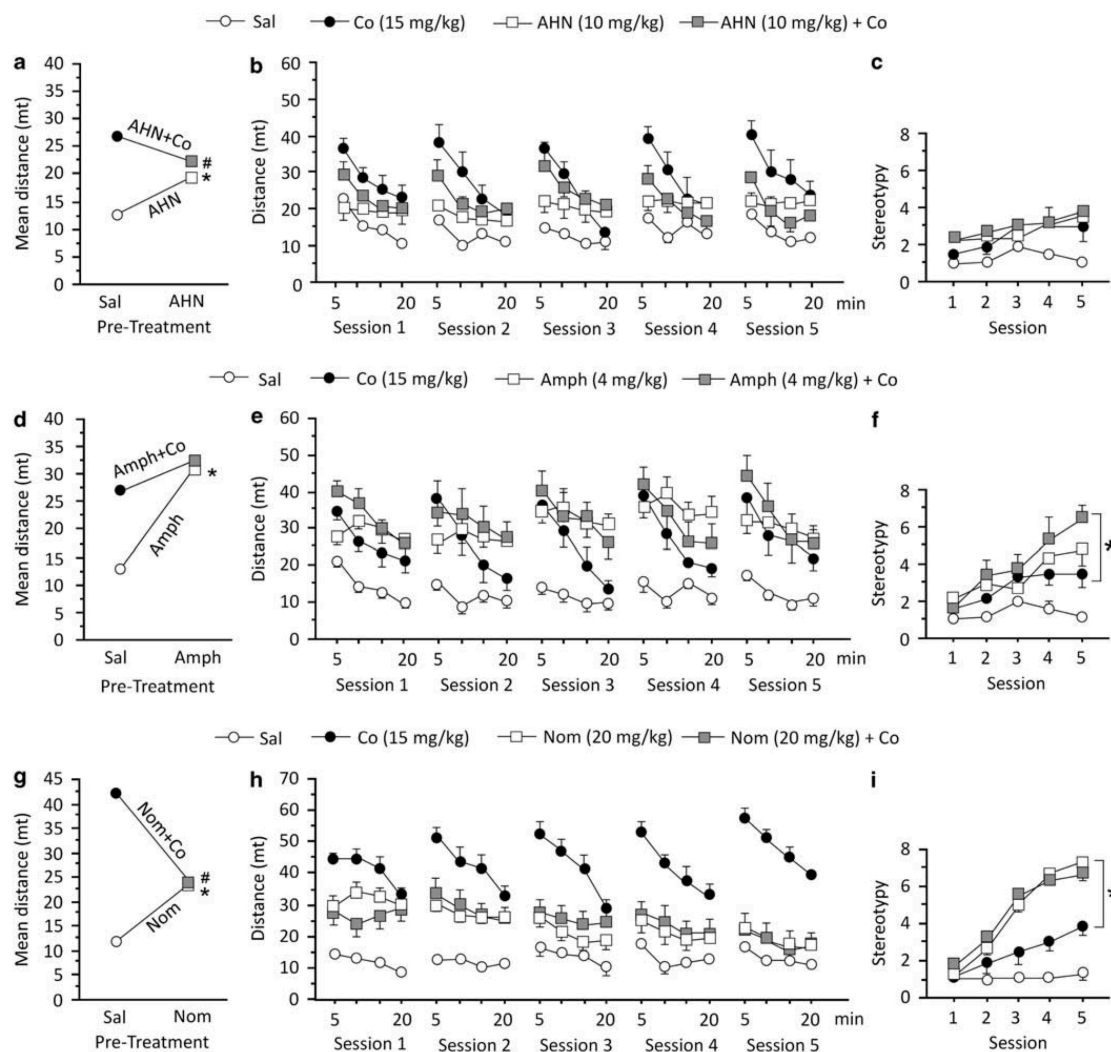


Figure 2 Effects of AHN-1055 (10 mg/kg), D-amphetamine (4 mg/kg), and nomifensine (20 mg/kg) on cocaine-stimulated locomotor activity and motor stereotypy. When administered as a pretreatment, AHN-1055 reduced cocaine-induced hyperactivity (a, b) without potentiating the expression of stereotyped behaviors (c). By contrast, D-amphetamine showed more effectiveness than the BZT analog at stimulating locomotor activity (d, e) and enhanced motor stereotypy evoked by cocaine treatment (f) without decreasing cocaine-induced locomotion (d, e). Nomifensine decreased cocaine-stimulated locomotor activity (g, h) but produced strong stereotypies after repeated administration (i). The scores for the five daily sessions are shown in (a, d, and g) and the time course of effects in (b, e, and h). (*) indicates significant differences ($p = 0.05$) from controls. (#) indicates significant differences ($p = 0.05$) from cocaine values.

cocaine-induced locomotor stimulation without increasing stereotyped behavior, repeated administration of nomifensine gave rise to sensitized, persistent head movements, and jerky body movements of high intensity ($F = 90.577$, $p = 0.0001$; $p < 0.05$ by G-H test) (Figure 2i). Thus, the effects of AHN-1055 and nomifensine were clearly different with regards to the induction of motor stereotypy.

It is noteworthy that in the case of D-amphetamine, given alone or in combination with cocaine, the induction of intense motor stereotypies did not seem to attenuate the

expression of hyperlocomotion, which did not decrease with repeated exposure (Figure 2e). In fact, the behavior of several animals treated with D-amphetamine and cocaine combined could be best described as 'stereotyped locomotion', a form of stimulant-induced hyperactivity characterized by repetitive selection of running paths (Bonasera *et al*, 2008). Upon repeated treatment with nomifensine, however, motor behaviors became more focused and spatially confined, and locomotor activity seemed to decrease gradually as a result (Figure 2h).

AHN-1055 Blocks Cocaine-Induce CPP and Neuronal Activation in the Striatum

We next studied the extent to which AHN-1055 treatment was able to influence cocaine-induced conditioned reward in the CPP paradigm. In parallel, we studied changes in locomotor activity and striatal early-gene expression in mice that were conditioned but killed after the last-conditioning session. The results of the behavioral and early-gene assays are depicted in Figures 3 and 4. For the CPP experiment, ANOVA was carried out with two between-

subjects variables, pretreatment, with four levels (0, 1, 3, and 10 mg/kg AHN-1055), and posttreatment, with two levels (saline/cocaine) and one within-subjects variable, conditioning, with two levels (preconditioning and postconditioning). ANOVA indicated a significant high order effect pretreatment \times posttreatment \times conditioning ($F = 2.943$, $p = 0.0376$). Although there were no differences between the experimental groups in the preconditioning ratios, *post hoc* analysis of the data showed that cocaine exposure produced significant CPP. By contrast, AHN-1055 did not produce CPP, or place aversion, at any dose. Most remarkably, pretreatment with

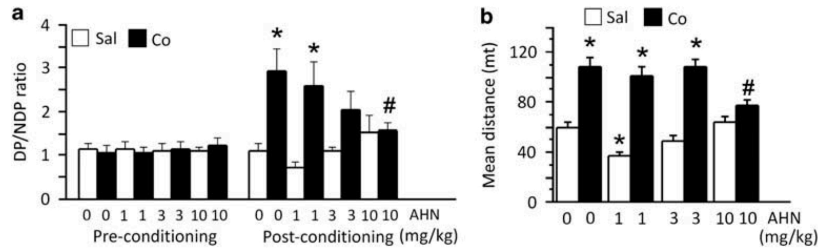


Figure 3 Effects of AHN-1055 (0, 1, 3, and 10 mg/kg) on locomotor activity and place preference and interactions with cocaine. Conditioning effects in the CPP procedure are shown in (a). AHN-1055 failed to elicit conditioning at any of the doses evaluated. When given before cocaine exposure, the analog dose-dependently blocked cocaine-induced CPP. Overall mean distance travelled during the drug conditioning sessions is shown in (b). The low dose of AHN-1055 induced inhibitory effects on locomotor activity, but the high dose was without effect over the 4-day exposure period. AHN-1055 significantly reduced cocaine-stimulated locomotor activity. (*) indicates significant differences ($p = 0.05$) from control values and (#) indicates significant deviations ($p = 0.05$) from cocaine values. DP/NDP, drug paired/non drug paired.

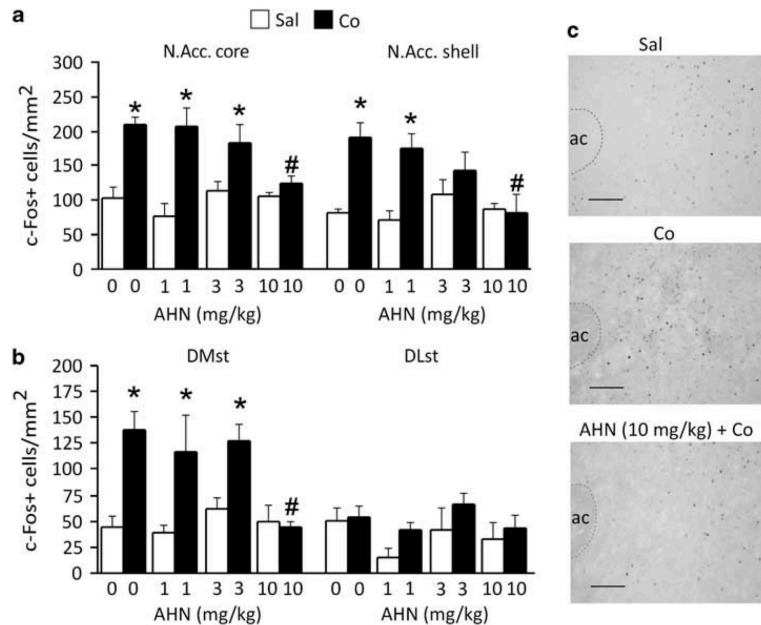


Figure 4 Interactions of AHN-1055 (0, 1, 3, and 10 mg/kg) with cocaine on c-Fos induction in conditioned mice. AHN-1055 did not increase c-Fos expression in any of the striatal regions investigated. However, the BZT analog prevented cocaine-induced c-Fos expression in the N Acc core, N Acc shell and DMst (a, b). Digital photomicrographs of c-Fos expression in the ventral striatum after treatment with vehicle, cocaine and the combination of the high dose of AHN-1055 with cocaine are shown in (c). (*) indicates significant differences ($p = 0.05$) from control values and (#) indicates significant deviations ($p = 0.05$) from cocaine values. ac, anterior commissure. Scale bar 100 μ m.

AHN-1055 dose-dependently blocked cocaine-induced CPP (Figure 3b).

We next investigated locomotor activity and c-Fos expression in mice that were killed after the last-conditioning session. ANOVA was calculated with two between-subjects variables, pretreatment, with four levels (0, 1, 3, and 10 mg/kg AHN-1055), and posttreatment, with two levels (saline/cocaine) and one within-subjects variable, session, with four levels (4 days of drug conditioning). The locomotor activity assays confirmed our earlier data indicating that AHN-1055 attenuated the locomotor stimulation induced by cocaine. The results showed a significant interaction pretreatment \times posttreatment ($F = 3.221$, $p = 0.033$), indicating that the effect of cocaine was dependent on earlier exposure to AHN-1055. The high dose of the AHN-1055 inhibited the locomotor activity evoked by cocaine ($p < 0.01$ by N-K test) (Figure 3a). The suppressing effects of the BZT analog on cocaine-induced locomotor activity were homogeneous across sessions. When we examined the data averaged for the four sessions, we observed a significant inhibitory effect of the low dose of AHN-1055 ($p < 0.05$ by N-K test), which was consistent through the 4 days of administration. The high dose was stimulant during the first session, but the mice developed tolerance to the activating effects of the BZT analog (data not shown). This finding is at variance with the results obtained in the earlier experiment in which high doses of AHN-1055 did not produce tolerance when administered daily, instead of given on alternate days.

We sought to determine whether the early-gene activation in the striatum correlated with the behavioral effects observed, both in the locomotor and CPP assays. Figure 4 shows the results. After 4 days of treatment, cocaine enhanced the expression of c-Fos in the N Acc core ($F = 10.90$, $p = 0.0001$; $p < 0.05$ by N-K test), N Acc shell ($F = 6.068$, $p = 0.0002$; $p < 0.05$ by N-K test), DMst ($F = 7.58$, $p < 0.0001$; $p < 0.05$ by N-K test), but not in the DLst ($F = 0.9055$, $p = 0.515$), whereas treatment with AHN-1055 alone was without effect at any dose in any of the regions studied (Figure 4a, b and c). It is noted that the BZT analog prevented the induction of c-Fos in the same regions where cocaine effectively produced significant elevations.

DISCUSSION

The design and synthesis of *N*-substituted BZT analogs has provided new tools to explore the functional correlates of DAT activity. As a result, new avenues have been opened for reducing the adverse effects caused by the administration of cocaine and other stimulants with functional activity at the DAT. These experiments provide an ample set of novel behavioral observations that characterize the behavioral and neurochemical effects of the BZT analog, AHN-1055, and its interactions with cocaine in mice. Albeit AHN-1055 and parent compounds were first synthesized more than a decade ago, their potential as pharmacotherapies for cocaine addiction has not been sufficiently investigated in preclinical models. The data presented showed by means of complementary experiments that the BZT analog, despite its ability to bind with high affinity to the DAT, does not behave as a classical psychomotor stimulant and, most notably, does attenuate, or completely prevents, the

activating effects of cocaine on striatal early-gene expression as well as some clinically relevant behavioral correlates of cocaine administration, including locomotor activity and conditioned reward.

We first studied the effects of AHN-1055 on locomotor activity and c-Fos expression in the striatum. AHN-1055 displayed inhibitory effects on locomotor activity at a low dose and stimulant effects at a high dose. The paradoxical effects of AHN-1055 observed in these experiments are consistent with earlier studies in the rat (Li *et al*, 2005). The pharmacological actions responsible for the inhibitory effect of the BZT analog are unclear. One possibility is that low doses of AHN-1055 produce weak elevations in extracellular dopamine concentrations, which preferentially stimulate dopamine autoreceptors, thereby producing a net decrease in the dopamine transmission. Alternatively, threshold elevations of extracellular dopamine could activate D2/D3-like postsynaptic receptors, whose selective stimulation has been associated with motor inhibition (Canales and Iversen, 1998; Canales and Iversen, 2000). Most remarkably, the biphasic pattern of locomotor activity observed after treatment with AHN-1055 is unlike that observed after administration of classical psychomotor stimulants, such as cocaine and *D*-amphetamine.

After acute administration, the paradoxical biphasic dose-response curve displayed by the BZT analog in the locomotor activity assays was paralleled by biphasic changes in early-gene activation in the striatum. AHN-1055 induced significant elevations in c-Fos protein expression in the DLst at the high dose, whereas evoking anatomically distributed but marginal downshifts at low and moderate doses. Again, this pattern of striatal activation induced by the BZT analog differed from that of cocaine, which evoked potent effects on early-gene expression in the ventral and dorsal striatal domains, as reported earlier (Canales and Graybiel, 2000; Canales, 2005). Other psychomotor stimulants, including *D*-amphetamine and methylphenidate, also diverged from AHN-1055 with regard to this dorsal-ventral selectivity (Moratalla *et al*, 1992; Robertson and Jian, 1995; Chase *et al*, 2005). The effects evoked by AHN-1055 on early-gene expression in the DLst could be attributed not only to the dopaminergic activity of the BZT analog but also to its anticholinergic profile, as other muscarinic receptor antagonists, including atropine and scopolamine, induced c-Fos protein in this striatal sector (Bernard *et al*, 1993).

In the interaction experiments performed with AHN-1055, *D*-amphetamine, and nomifensine, the BZT analog induced mild but significant stimulant effects on locomotor activity at the high dose. In the CPP experiments, locomotor stimulation was apparent after acute treatment with AHN-1055 but the stimulant effect decreased with repeated exposure. It should be noted that no such tolerance to the stimulant effects of AHN-1055 was observed when the BZT analog was administered daily in the interactions assays. AHN-1055 is a long-acting compound, exhibiting elevated plasma and brain concentrations over prolonged periods of time, which exceed 24 h in rat assays (Raje *et al*, 2003). It is probable that brain accumulation of the BZT analog after daily administration counteracted the expression of tolerance to the stimulant effects of the drug, although further experiments are required to test this hypothesis.

An important result that emerged from the interaction assays is that AHN-1055 significantly attenuated cocaine-induced locomotor activity. Such property has been shown earlier for another BZT derivative, JHW007 (Desai *et al*, 2005b). Clearly, AHN-1055 could have potentiated the effects of cocaine because the level of locomotion evoked by the reference dose of cocaine was far from ceiling levels, as evidenced by the effects induced by both D-amphetamine treatment and combined treatment with D-amphetamine and cocaine. Further, the attenuation produced by the BZT derivative did not result from an enhancement of seemingly competitive behaviors, such as stereotypy. By contrast to the effects of the BZT analog, D-amphetamine increased cocaine-induced locomotor activity when administered as a pretreatment. Combined D-amphetamine and cocaine treatment produced both robust locomotion and stereotyped behavior. This was largely caused by the induction of routetracing stereotypies, which are a correlate of incremented striatal activity in mice (Bonasera *et al*, 2008). Critically, the BZT analog also differed from the DAT inhibitor nomifensine, which attenuated cocaine-induced locomotor activity but induced by itself intense stereotypies after repeated exposure. Therefore, these data provide a clear behavioral demonstration that AHN-1055 differs from a prototypical psychomotor stimulant drug, D-amphetamine, and from another DAT inhibitor, nomifensine.

Having found that AHN-1055 exerted substantial antagonistic actions on cocaine-stimulated locomotor behavior, we asked whether the BZT analog could influence the subjective effects of cocaine, as measured in the place conditioning procedure, as well as the activation of brain circuits involved in drug-induced reward. Activation of telencephalic circuits spanning through the N Acc has been consistently associated with reward-related learning and drug-associated plasticity (Carelli, 2002; Ikemoto, 2007; Robinson and Kolb, 2004). The results showed that the BZT analog did not produce CPP when given 1 h before conditioning. This finding confirms and extends earlier observations indicating that AHN-1055 failed to induce CPP when administered at varying time points ranging from 0 to 90 min before conditioning, although within a dose range lower than that used in these experiments (Li *et al*, 2005). In line with these behavioral observations, our neurochemical assays showed that the BZT analog did not produce significant variations in c-Fos inducibility in any of the striatal regions after repeated administration and conditioning. Even the effects observed in the DLst after acute administration of AHN-1055 waned with repeated treatment. This neuroadaptation, which might reflect compensatory changes in response to sustained elevations in dopamine concentrations, closely paralleled the lack of stimulatory effects of AHN-1055 on locomotor activity after repeated exposure. Conversely, repeated cocaine exposure and place conditioning provoked potent effects on early-gene expression in the core and shell sectors of the N Acc and DMst. It is noteworthy that acute cocaine treatment did not elevate c-Fos levels in the shell sector of the N acc, but the early-gene response did sensitize with repeated exposure, as earlier shown in rats (Brenhouse and Stellar, 2006). A novel finding of these experiments was that pretreatment with the BZT analog blocked cocaine-stimulated CPP. It is noted that AHN-1055 also prevented in

cocaine-conditioned mice the induction of early-gene activation in the N Acc and DMst, a finding that provides insight into the neural mechanisms underlying the ability of AHN-1055 to largely suppress the unconditioned and conditioned effects of cocaine.

These findings are best interpreted in the context of recent comparative molecular modelling studies. It has long been postulated that if cocaine-induced inhibition of dopamine transport resulted from allosteric modulation of the DAT, then it would be formally possible to design new molecules that might block cocaine's actions without affecting dopamine transport directly. Studies involving homology modelling and molecular simulation suggested that dopamine binds to the DAT in a hydrophobic pocket buried between transmembrane domains 1, 3, 6, and 8 (Huang and Zhan, 2007; Beuming *et al*, 2008). Using multiple docking approaches and mutagenesis, psychostimulant recognition sites for cocaine and D-amphetamine have been shown to extensively overlap with that of the endogenous substrate, dopamine (Indarte *et al*, 2008; Beuming *et al*, 2008). Therefore, the non-allosteric nature of cocaine's binding to the DAT renders the design of cocaine antagonists, which do not function as uptake inhibitors extremely troublesome. Interestingly, BZT derivatives, including JHW007 and MFZ 2-71, also bind in the vestibule at a site overlapping with that of dopamine (Beuming *et al*, 2008). In the light of such molecular findings, the most parsimonious explanation for the current data is that treatment with AHN-1055 diminished the ability of cocaine to induce neurochemical and behavioral effects through direct competition for a binding site at the DAT. Further studies should be performed to assess the contribution of muscarinic M1 receptors to cocaine-related neurochemical and behavioral effects, although our data with other BZT analogs with very low affinity for muscarinic M1 receptors suggest that their activity as DAT blockers is sufficient to reproduce the antagonistic behavioral actions of AHN-1055 (unpublished observations), in agreement with some earlier indications (Desai *et al*, 2005b).

In summary, these findings showed that AHN-1055, a BZT analog that exhibited weak pharmacological effects in early-gene, locomotor activity, and CPP assays, displayed marked antagonistic actions against cocaine. These observations provide support for further investigation of candidate medications that share a diphenylmethyl moiety, including BZT analogs, such as AHN-1055, modafinil (Dackis *et al*, 2005), and GBR series compounds (Rothman *et al*, 2008). Most notably, these findings highlight the possibility of designing novel compounds with affinity for the DAT which, by virtue of their differential pharmacokinetic/dynamic profile and mode of interaction with the DAT, might effectively antagonize the neuronal and behavioral actions of cocaine, even if they function as dopamine transport inhibitors.

DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The author(s) declare that, except for income received from our primary employers, no financial support or compensation has been received from any individual or corporate entity over the past 3 years for research or professional

service and there are no personal financial holdings that could be perceived as constituting a potential conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants to JJC from Plan Nacional de Biomedicina (Ministerio de Ciencia e Innovación), Plan Nacional Sobre Drogas (Ministerio de Sanidad y Consumo), Red de Trastornos Adictivos (RETICS, Instituto de Salud Carlos III), and FEPAD (Fundación para el Estudio y Prevención de las Adicciones y Drogodependencias, Generalitat Valenciana). CV-S is in receipt of a graduate student contract from Red de Trastornos Adictivos (RETICS, Instituto de Salud Carlos III). We thank Alexandra Arcusa for technical assistance.

REFERENCES

- Agoston GE, Wu JH, Izenwasser S, George C, Katz J, Kline RH *et al* (1997a). Novel N-substituted 3 α -[bis(4'-fluorophenyl)-methoxy]tropane analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *J Med Chem* 40: 4329–4339.
- Agoston GE, Wu JH, Izenwasser S, George C, Katz J, Kline RH *et al* (1997b). Novel N-substituted 3 α -[bis(4'-fluorophenyl)-methoxy]tropane analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *J Med Chem* 40: 4329–4339.
- Bernard V, Dumartin B, Lamy E, Bloch B (1993). Fos immunoreactivity after stimulation or inhibition of muscarinic receptors indicates anatomical specificity for cholinergic control of striatal efferent neurons and cortical neurons in the rat. *Eur J Neurosci* 5: 1218–1225.
- Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, Gracia L, Raniszewska K *et al* (2008). The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat Neurosci* 11: 780–789.
- Bonasera SJ, Schenk AK, Luxenberg EJ, Tecott LH (2008). A novel method for automatic quantification of psychostimulant-evoked route-tracing stereotypy: application to *Mus musculus*. *Psychopharmacology (Berl)* 196: 591–602.
- Brenhouse HC, Stellar JR (2006). c-Fos and deltaFosB expression are differentially altered in distinct subregions of the nucleus accumbens shell in cocaine-sensitized rats. *Neuroscience* 137: 773–780.
- Canales JJ (2005). Intermittent cortical stimulation evokes sensitization to cocaine and enduring changes in matrix and striosome neuron responsiveness. *Synapse* 57: 56–60.
- Canales JJ, Gilmour G, Iversen SD (2000). The role of nigral and thalamic output pathways in the expression of oral stereotypies induced by amphetamine injections into the striatum. *Brain Res* 856: 176–183.
- Canales JJ, Graybiel AM (2000). A measure of striatal function predicts motor stereotypy. *Nat Neurosci* 3: 377–383.
- Canales JJ, Iversen SD (1998). Behavioural topography in the striatum: differential effects of quinpirole and D-amphetamine microinjections. *Eur J Pharmacol* 362: 111–119.
- Canales JJ, Iversen SD (2000). Dynamic dopamine receptor interactions in the core and shell of nucleus accumbens differentially coordinate the expression of unconditioned motor behaviors. *Synapse* 36: 297–306.
- Carrelli RM (2002). The nucleus accumbens and reward: neurophysiological investigations in behaving animals. *Behav Cogn Neurosci Rev* 1: 281–296.
- Carrigan KA, Dykstra LA (2007). Behavioral effects of morphine and cocaine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Psychopharmacology (Berl)* 191: 985–993.
- Chase TD, Carrey N, Brown RE, Wilkinson M (2005). Methylphenidate regulates c-fos and fosB expression in multiple regions of the immature rat brain. *Brain Res Dev Brain Res* 156: 1–12.
- Chen N, Reith ME (2007). Substrates and inhibitors display different sensitivity to expression level of the dopamine transporter in heterologously expressing cells. *J Neurochem* 101: 377–388.
- Chen N, Zhen J, Reith ME (2004). Mutation of Trp84 and Asp313 of the dopamine transporter reveals similar mode of binding interaction for GBR12909 and benztropine as opposed to cocaine. *J Neurochem* 89: 853–864.
- Dackis CA, Kampman KM, Lynch KG, Pettinati HM, O'Brien CP (2005). A double-blind, placebo-controlled trial of modafinil for cocaine dependence. *Neuropsychopharmacology* 30: 205–211.
- Dar DE, Mayo C, Uhl GR (2005). The interaction of methylphenidate and benztropine with the dopamine transporter is different than other substrates and ligands. *Biochem Pharmacol* 70: 461–469.
- Desai RI, Kopajtic TA, French D, Newman AH, Katz JL (2005a). Relationship between. *J Pharmacol Exp Ther* 315: 397–404.
- Desai RI, Kopajtic TA, Koffarnus M, Newman AH, Katz JL (2005b). Identification of a dopamine transporter ligand that blocks the stimulant effects of cocaine. *J Neurosci* 25: 1889–1893.
- Dutta AK, Zhang S, Kolhatkar R, Reith ME (2003). Dopamine transporter as target for drug development of cocaine dependence medications. *Eur J Pharmacol* 479: 93–106.
- Grabowski J, Shearer J, Merrill J, Negus SS (2004). Agonist-like, replacement pharmacotherapy for stimulant abuse and dependence. *Addict Behav* 29: 1439–1464.
- Hernandez-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Perez-Villaba A, Arcusa A *et al* (2008). The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiol Learn Mem* 90: 553–559.
- Huang X, Zhan CG (2007). How dopamine transporter interacts with dopamine: Insights from molecular modeling and simulation. *Biophys J* 93: 3627–3639.
- Ikemoto S (2007). Dopamine reward circuitry: two projection systems from the ventral midbrain to the nucleus accumbens-olfactory tubercle complex. *Brain Res Rev* 56: 27–78.
- Indarte M, Madura JD, Surratt CK (2008). Dopamine transporter comparative molecular modeling and binding site prediction using the LeuT(Aa) leucine transporter as a template. *Proteins* 70: 1033–1046.
- Karila L, Gorelick D, Weinstein A, Noble F, Benyamina A, Coscas S *et al* (2008). New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int J Neuropsychopharmacol* 11: 425–438.
- Katz JL, Agoston GE, Alling KL, Kline RH, Forster MJ, Woolverton WL *et al* (2001). Dopamine transporter binding without cocaine-like behavioral effects: synthesis and evaluation of benztropine analogs alone and in combination with cocaine in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* 154: 362–374.
- Katz JL, Izenwasser S, Kline RH, Allen AC, Newman AH (1999). Novel 3 α -diphenylmethoxytropane analogs: selective dopamine uptake inhibitors with behavioral effects distinct from those of cocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 302–315.
- Katz JL, Kopajtic TA, Agoston GE, Newman AH (2004). Effects of N-substituted analogs of benztropine: diminished cocaine-like effects in dopamine transporter ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 309: 650–660.
- Kosten T, Owens SM (2005). Immunotherapy for the treatment of drug abuse. *Pharmacol Ther* 108: 76–85.
- Li SM, Newman AH, Katz JL (2005). Place conditioning and locomotor effects of N-substituted, 4',4''-difluorobenztropine analogs in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 1223–1230.
- Loland CJ, Desai RI, Zou MF, Cao J, Grundt P, Gerstbrein K *et al* (2008). Relationship between conformational changes in the dopamine transporter and cocaine-like subjective effects of uptake inhibitors. *Mol Pharmacol* 73: 813–823.



The high affinity dopamine uptake inhibitor, JHW 007, blocks cocaine-induced reward, locomotor stimulation and sensitization

C. Velázquez-Sánchez^a, A. Ferragud^a, J. Murga^b, M. Cardá^b, J.J. Canales^{a,*}

^a Biopsychology and Comparative Neuroscience Group, Cavanilles Institute (ICBiBE), University of Valencia-FGUV, Valencia, Spain

^b Department of Organic and Inorganic Chemistry, University Jaime I, Castellón, Spain

Received 27 August 2009; received in revised form 12 January 2010; accepted 18 March 2010

KEYWORDS

Cocaine;
Benztropine analogues;
Locomotor activity;
Sensitization;
Place preference;
Anxiety

Abstract

The discovery and evaluation of high affinity dopamine transport inhibitors with low abuse liability is an important step toward the development of efficacious medications for cocaine addiction. We examined in mice the behavioural effects of (*N*-(*n*-butyl)-3 α -[bis(4'-fluorophenyl) methoxy]-tropane) (JHW 007), a benztropine (BZT) analogue that blocks dopamine uptake, and assessed its potential to influence the actions of cocaine in clinically-relevant models of cocaine addiction. In the conditioned place preference (CPP) paradigm, JHW 007 exposure did not produce place conditioning within an ample dose range but effectively blocked the CPP induced by cocaine administration. Similarly, in the CPP apparatus JHW 007 treatment failed to stimulate locomotor activity at any dose but dose-dependently suppressed the hyperactivity evoked by cocaine treatment. In locomotor sensitization assays performed in the open field, JHW 007 did not produce sensitized locomotor behaviour when given alone, but it prevented the sensitized component of the locomotor response elicited by subchronic (8-day) cocaine exposure. In the elevated plus maze (EPM), acute treatment with JHW 007, cocaine and combinations of the BZT analogue and cocaine produced an anxiogenic-like profile. Re-test in the EPM following subchronic (8-day) exposure enhanced the anxiogenic-like effect of the same drug treatments. The present findings indicate that JHW 007 exposure counteracts some critical behavioural correlates of cocaine treatment, including conditioned reward, locomotor stimulation and sensitization, and lend support to the further development of BZT analogues as potential replacement medications in cocaine addiction.

© 2010 Elsevier B.V. and ECNP. All rights reserved.

* Corresponding author. Biopsychology & Comparative Neuroscience Group, "Cavanilles" Institute (ICBiBE), University of Valencia-FGUV, Polígono de la Coma s/n, Paterna, 46980 Valencia, Spain. Tel.: +34 963 543 768(office), +34 963 543 457(lab); fax: +34 963 543 670.

E-mail address: juan.canales@uv.es (J.J. Canales).

1. Introduction

Cocaine addiction is a chronic neuropsychiatric disorder that poses a severe burden for the individuals affected and society. The pharmacological treatment of cocaine addiction has relied thus far on dopamine (DA) agonists, antidepressants and GABA medications (Karila et al., 2008; Sofuoglu and Kosten, 2006; Minozzi et al., 2008), while other strategies, such as vaccination (Orson et al., 2009), remain to be fully developed and evaluated. There is substantial agreement that interference with the DA transporter (DAT) is required for cocaine to induce psychostimulant effects. The potency of cocaine-like drugs to sustain self-administration in animals was shown to correlate with their binding affinity at the DAT (Ritz et al., 1987). Further, a correlation was found between DAT occupancy by cocaine and the magnitude of self-reported "high" in humans (Volkow et al., 1997). Another factor deemed important was the rate of DAT occupancy, as uptake inhibitors with slow DAT occupancy, such as methylphenidate, do not uniformly evoke euphorogenic effects despite producing significant DAT blockade (Volkow et al., 1996; Volkow et al., 1999). Moreover, several DAT blockers, including bupropion and nomifensine, have not been reported to induce euphoria or possess significant abuse liability. Taken together, these findings fuelled the concept of agonist or replacement treatment in cocaine addiction by means of slow-onset, long-acting DAT inhibitors (Rothman, 1990; Grabowski et al., 2004).

The design of compounds with low abuse potential that could block the actions of cocaine is hindered by the fact that dopamine, cocaine and amphetamine bind at extensively overlapping recognition sites at the DAT (Indarte et al., 2008; Beuming et al., 2008). However, binding to the DAT and subsequent transport inhibition does not invariably produce cocaine-like effects (Katz et al., 1997) (Newman and Katz, 2009). One of the most promising leads toward the development of effective substitute medications for cocaine addiction was the discovery of the benztropine (BZT) class of DAT inhibitors. Chemical substitutions of the parent BZT molecule generated a large number of analogues, some of which showed enhanced potency for inhibition of DA uptake and atypical pharmacokinetic/dynamic properties that are distinct from those of cocaine (Newman and Agoston, 1998; Newman and Kulkarni, 2002). Some BZT analogues exhibited rates of DAT occupancy slower than that of cocaine (Desai et al., 2005) and provoked long-lasting increases in striatal dopamine release (Raje et al., 2005; Tanda et al., 2009). Most remarkably, some BZT analogues, including AHN-1055 and JHW 007, appeared to be devoid of strong psychostimulant effects (Desai et al., 2005; Hiranita et al., 2009), thus supporting their candidacy as potential medications for cocaine addiction.

We showed previously that the *N*-substituted BZT analogue, AHN-1055, prevented cocaine-induced striatal early-gene expression, locomotor activity and conditioned reward (Velázquez-Sánchez et al., 2009), and displayed low abuse liability in self-administration and relapse assays (Ferragud et al., 2009). The antagonistic effects of AHN-1055 can be ascribed to DAT interference but also to its anticholinergic profile, as this BZT analogue readily antagonizes muscarinic M1 receptors. To gain insight into the relative contribution of

these targets, we studied the behavioural effects of JHW 007, an *N*-substituted BZT analogue with 10-fold selectivity for DAT versus M1 receptors and >50-fold versus serotonin and norepinephrine transporters. To characterize the behavioural profile of JHW 007, we used conditioned place preference (CPP), locomotor stimulation and anxiety-like behavioural assays in which the BZT analogue was administered alone and in combination with cocaine.

2. Experimental procedures

2.1. Subjects

Male Swiss OF1 mice ($N=188$) purchased from Charles River (Barcelona, Spain) served as experimental subjects. Mice were 5–6 week of age upon arrival at the laboratories and were allowed 4–7 days to acclimatize to the animal facility before the experiments began. Mice were housed in groups of 4 subjects with food and water available *ad libitum*. The housing room was maintained under standard conditions of temperature (21 ± 2 °C) and humidity (45–55%) and was kept on a 12 h light–dark cycle (lights on at 9 AM). All experiments were carried out in accordance with current European directives (86/609/ECC) for animal experimentation and were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy of the University of Valencia.

2.2. Pharmacological treatments

Cocaine hydrochloride (Laboratorios Alcaiber S.A., Madrid, Spain) was dissolved in 0.9% ClNa and injected at a dose of 15 mg/kg *i.p.* in the CPP, locomotor activity and open field experiments and at doses of 5 and 15 mg/kg *i.p.* in the plus maze experiment. The BZT analogue, JWH007 [(*N*-(*n*-butyl)-3 α -[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]-tropene)], was synthesized as described previously (Agoston et al., 1997). Purity of the product exceeded 98%, as measured by magnetic resonance. The analogue was dissolved in 0.9% ClNa, sonicated for complete solubilization and injected at doses of 1, 3, and 10 mg/kg *i.p.* in the CPP, at doses of 15 mg/kg *i.p.* in the open field experiment and at doses of 5 and 15 mg/kg *i.p.* in the plus maze experiment. Dose selection for the BZT analogue was based on previous pilot experiments. All compounds used were prepared fresh before administration and the resulting solutions were injected at a constant volume of 10 ml/kg.

2.3. Behavioural assays

CPP and locomotor activity were measured as described previously (Velázquez-Sánchez et al., 2009). We used place conditioning chambers and an automated videotracking and software system (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France), which rendered unbiased information on the location of the mice, the time spent in each compartment of the CPP apparatus and the distance travelled during the assay. The chambers consisted of two equally-sized compartments interconnected by a small rectangular corridor with transparent walls and a Perspex floor. One of the compartments had black walls and white circles and a metal floor with small perforated holes. The other compartment had black walls with white stripes and a metal floor with a grid-like pattern. Mice ($N=95$) were allowed to explore the apparatus for 15 min in two consecutive days, the last of which was taken as a baseline (pre-conditioning phase). Mice that spent more than 70% of the time in one of the compartments during the baseline were excluded from the CPP study ($n=19$). Once exclusions were made, mice were assigned to one of eight experimental groups ($n=8$ –11) receiving saline or JHW007 (1, 3, 10 mg/kg) as pre-treatment followed by saline or cocaine (15 mg/kg). JHW 007 was administered 1 h before cocaine or saline challenges since the effects of the BZT analogue on dopamine release last several hours (Tanda et al., 2009). Treatments were

administered over eight consecutive days, alternating drug sessions with vehicle sessions (conditioning phase). After the treatments, mice were confined individually in one of the compartments for 30 min. An unbiased design was used. The CPP test was performed 24 h after the last conditioning session (post-conditioning phase). Mice were placed in the CPP apparatus in a drug-free state and were allowed to explore it for 15 min. The time spent in each compartment was measured. For analysis purposes, we calculated the percentage of time spent in each compartment relative to the total time. The change induced by drug conditioning in the preference for the drug-paired compartment was estimated as the ratio between the percent of time spent in the drug-paired and the vehicle-paired compartments (Velazquez-Sanchez et al., 2009). The distance travelled was recorded during the drug conditioning sessions, as a measure of locomotor activity.

Anxiety responses were measured in the elevated plus maze (EPM) (Lister, 1987). The experimental apparatus consisted of a central platform (5×5 cm) from which four arms (30 cm long×5 cm wide) extended. Two opposing arms were open and the other two were enclosed by a 16 cm high wall. The maze was made of black Plexiglas and was elevated to a height of 104 cm above the floor. The room was brightly lit with two overhead fluorescent lights, which produced similar levels of illumination on both open and closed arms. White noise was generated by computer software (Audacity 1.2.6, <http://audacity.sourceforge.net/>) and was played through loudspeakers during the assays. Two experimenters were present in the room to collect data during the tests. To avoid interference with the task, the observers sat behind an opaque panel and examined the behaviour of the mice through a computer screen. The test consisted in placing the animal on the platform facing an open arm and allowing it to explore the maze for 5 min. We first studied the acute effects of JHW 007, cocaine and combinations thereof. We slightly adjusted the doses of the BZT analogue based on the results of the previous CPP and locomotor activity experiments. Mice were assigned to one of 7 experimental groups ($n=7$) receiving saline or JHW007 (5 or 15 mg/kg) as a pre-treatment followed by saline or cocaine (5 or 15 mg/kg) 1 h later. The test began 10 min after the cocaine or saline challenges. Videotracking software (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France) was used to monitor the behaviour of the mice. The time spent in the open and closed arms of the EPM and the distance travelled were automatically measured. Videos were also recorded and the number of head dips in the open arms (downward movement of rodents' head toward the floor from the open arms), a risk-assessment parameter, was measured by a blind observer. Following the acute test, drugs continued to be administered daily in the housing room for one week. Mice were drug challenged the following day and a re-test was performed in the EPM under the same experimental conditions.

The ability of JHW 007 to modulate the sensitizing effects of subchronic cocaine was evaluated in the open field. The regimen of drug administration was identical to that used in the EPM paradigm. The experimental apparatus consisted of a black Plexiglas square (100×100×35 cm) divided into four quadrants (50×50 cm). The mice ($N=44$) were allowed to habituate to the open field for 30 min on two consecutive days. On the third day, the animals were assigned to one of four experimental groups ($n=10-14$) receiving saline or JHW007 (15 mg/kg) 1 h before saline or cocaine challenge (15 mg/kg). Mice were placed individually in one of the compartments of the open field for 30 min. During the next six days, mice received the same treatments in their home cages but were not tested. On day eight, mice received the same drugs and were re-tested in the open field for 30 min. Videotracking software (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France) was used to measure locomotor activity.

2.4. Data analysis

Data were analyzed by ANOVA using StatView 5.0 software. Main effects and interaction effects in the ANOVA were analyzed by the

Newman-Keuls procedure using the overall sampling error from the ANOVA as denominator. Statistical significance was set at $\alpha=0.05$ per experiment.

3. Results

To investigate the ability of JHW 007 to influence cocaine-induced conditioned reward in the CPP paradigm, mice received different doses of BZT analogue as a pre-treatment and saline or cocaine as a post-treatment. Fig. 1 shows the results. ANOVA was carried out with one between-subject variable, Treatment, with eight levels (eight groups of treatment) and one within-subjects variable, Conditioning, with two levels (pre-conditioning and post-conditioning). ANOVA indicated a significant effect of the Treatment ($F_{7,66}=3.456$, $p<0.003$) and a significant interaction Treatment×Conditioning ($F_{7,66}=3.589$, $p<0.003$). There were no significant differences between the experimental groups in the baseline pre-conditioning ratios. Post hoc tests revealed that cocaine exposure produced significant CPP, while JHW 007 did not evoke CPP or place aversion at any dose. Remarkably, pre-treatment with JHW 007 significantly attenuated the CPP induced by cocaine exposure (Fig. 1).

Locomotor activity was measured during the drug conditioning sessions. ANOVA was performed with one between-subjects variable, Treatment, with eight levels (eight groups of treatment) and one within-subjects variable, Session, with four levels (four days of drug conditioning). ANOVA indicated a significant effect of the Treatment factor ($F_{7,87}=19.527$, $p<0.001$) and a significant interaction Treatment×Session ($F_{7,261}=19.018$, $p<0.006$). The analogue was devoid of significant effects on locomotor activity when given alone either acutely or repeatedly over the different conditioning sessions (Fig. 2a). By contrast, cocaine treatment alone provoked consistent increases in locomotor behaviour on the four conditioning tests (Fig. 2a). JHW 007 completely blocked cocaine-induced hyperactivity, although with seemingly decreased efficacy as the conditioning sessions progressed, which coincided with a weak, not significant increase in locomotor activity produced by repeated treatment with the BZT analogue alone (Fig. 2a,b).

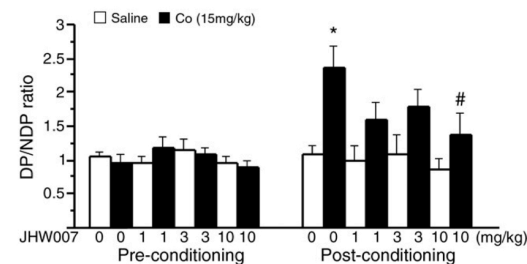


Figure 1 Effects of JHW 007 on conditioned place preference (CPP) and interactions with cocaine challenge. Cocaine exposure produced significant CPP, while JHW 007 did not elicit CPP or place aversion at any dose. JHW 007 significantly attenuated cocaine-induced CPP when the BZT analogue was given before cocaine administration. Bars indicate means±SEM. *, significantly different from control values ($p<0.05$ by Newman–Keuls tests); #, significantly different from cocaine values ($p<0.05$ by Newman–Keuls tests); DP/NDP = drug paired/non-drug paired.

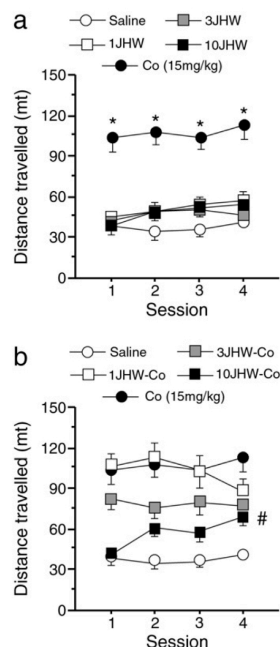


Figure 2 Locomotor activity induced by JHW 007, cocaine, and combinations thereof during the drug conditioning sessions. To ease visualization of the data, the effects of JHW 007 alone are shown in (a) and the interactions of the BZT analogue with cocaine in (b). JHW 007 did not produce significant changes in locomotor activity during the four days of treatment. By contrast, cocaine administration produced robust increases across all four days of exposure (a). Pre-treatment with JHW007 blocked cocaine-induced locomotor stimulation in a dose-dependent manner (b). Data represent means \pm SEM. *, significantly different from control values ($p < 0.05$ by Newman–Keuls tests); #, significantly different from cocaine values across all four time points ($p < 0.05$ by Newman–Keuls tests).

To investigate the anxiogenic/anxiolytic-like effects of the drug treatments, mice were placed in the EPM after challenge with JHW 007, cocaine and combinations of the BZT analogue and cocaine. Varying doses of JHW 007 (0, 5, 15 mg/kg) were administered and were followed by cocaine (15 mg/kg) or saline treatment for eight consecutive days. EPM behaviour was studied after acute (day 1) and subchronic (day 8) exposure to the drug treatments. To analyze the data, one-way ANOVA was performed with one between-subjects factor, Treatment, with seven levels (seven groups of treatment), using time spent in the open arms, head dips in the open arms and locomotor activity as dependent variables. Acute administration of JHW 007, cocaine or both JHW 007 and cocaine produced a variable response in terms of time spent in the open arms (Fig. 3a). All treatments reduced this parameter but differences from control values were not significant ($F_{6,40}=0.335$, $p < 0.915$). For head dips, however, ANOVA indicated a significant effect of the Treatment variable ($F_{6,40}=4.626$, $p < 0.001$). The number of head dips was dose-dependently decreased by both JHW 007 and cocaine, with the combination of JHW 007 and cocaine inducing the same effect (Fig. 3b). We next examined locomotor

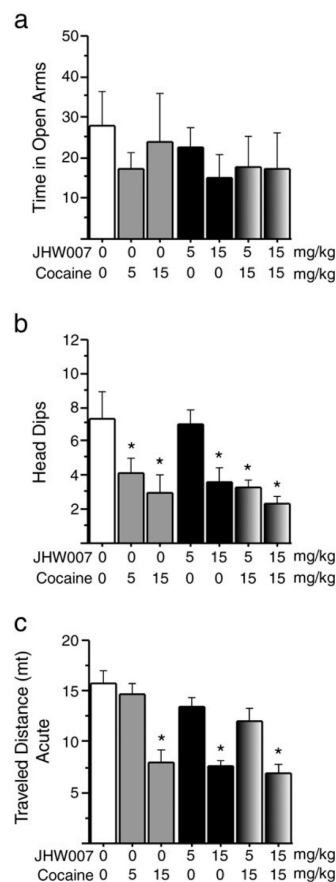


Figure 3 Anxiety-related behaviours and locomotor activity in the EPM following acute exposure to JHW 007, alone and in combination with cocaine treatments. All treatments slightly reduced the time spent by the mice in the open arms but differences were not significant (a). The number of head dips in the open arms was dose-dependently decreased by both JHW 007 and cocaine exposure, as was by combined treatment with the BZT analogue and cocaine (b). JHW 007 and cocaine dose-dependently suppressed locomotor activity in the EPM relative to control values. When JHW 007 was given as a pre-treatment before cocaine challenge, the effects were similar to those induced by treatment with the BZT analogue alone (c). Bars indicate means \pm SEM. *, significantly different from control values ($p < 0.05$ by Newman–Keuls tests).

activity in the EPM following acute exposure to the treatments (Fig. 3c). ANOVA showed a significant effect of the Treatment variable ($F_{6,40}=12.867$, $p < 0.001$). Newman–Keuls tests indicated that both JHW 007 and cocaine dose-dependently suppressed locomotor activity relative to control values. When JHW 007 and cocaine were given together, the locomotor effects induced by the combination were similar to those induced by treatment with the BZT analogue alone, that is, mild attenuation at the low dose and strong inhibition at the high dose.

After subchronic exposure, mice were re-exposed to the EPM and the same variables were measured. The time spent in the open arms was significantly affected by the drug treatments, as indicated by the ANOVA ($F_{6,40}=4.438$, $p<0.001$). JHW 007 and cocaine reduced the values for this variable, with low doses being seemingly more effective (Fig. 4a). The high dose of JHW

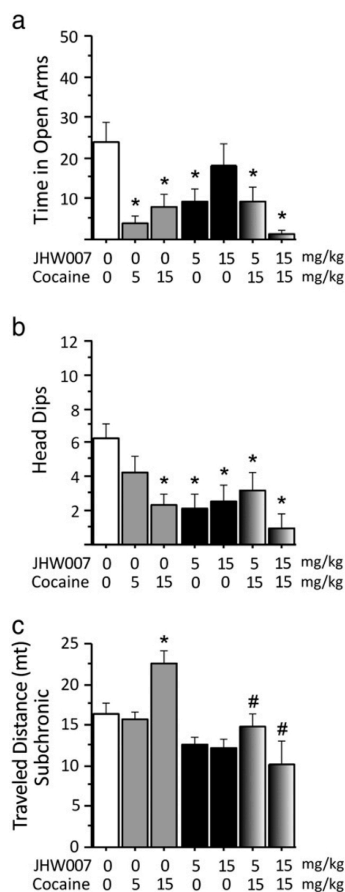


Figure 4 Re-test of anxiety-related behaviours and locomotor activity in the EPM after subchronic treatment with JHW 007, cocaine and combinations thereof. JHW 007 reduced the time spent in the open arms of the EPM but only at the lower dose. The high dose of the BZT analogue produced variable results. In turn, subchronic cocaine treatment induced marked open arm avoidance upon re-test, as did the combination of JHW 007 and cocaine (a). Subchronic treatment with JHW 007 and cocaine, administered alone or in combination, strongly suppressed head dipping behaviour (b). Subchronic treatment with cocaine produced a rebound locomotor effect in the EPM. Such rebound effect was not elicited by JHW 007. Moreover, the BZT analogue prevented the stimulant locomotor effects of subchronic cocaine exposure (c). Data represent means \pm SEM. *, significantly different from control values ($p<0.05$ by Newman–Keuls tests); #, significantly different from cocaine values ($p<0.05$ by Newman–Keuls tests).

007 induced an inconsistent response (4 mice showed responses similar to those of control subjects and three mice exhibited clear open arm avoidance), such that values for this treatment did not differ from those of the control group. Further, the combination of the BZT analogue and cocaine significantly reduced the time spent in the open arms. As in the acute paradigm, the results for head dips were more robust. The effect of the Treatment variable was significant in the ANOVA ($F_{6,40}=3.745$, $p<0.005$). Both JHW 007 and cocaine suppressed head dipping behaviour. While cocaine treatment dose-dependently decreased the number of head dips, the high and low doses of JHW 007 were equally effective. The combination of JHW 007 and cocaine also produced suppressing effects on this parameter (Fig. 4b). Finally, the analysis of the locomotor activity data in the EPM revealed striking effects. The results are shown in Fig. 4c. ANOVA indicated a significant effect of the Treatment factor ($F_{6,40}=7.325$, $p<0.0001$). The low doses of JHW 007 and cocaine did not induce significant changes in locomotor activity following subchronic exposure. However, the high doses of the drugs produced changes after intermittent exposure. The acute suppressing effects of the high dose of JHW 007 virtually waned with repeated treatment. Most significantly, the high dose of cocaine was not inhibitory, as was after acute exposure, but highly stimulant compared to the control treatment. Mice treated repeatedly with cocaine invariably travelled from one of the closed arms to the other in stereotypic fashion. Neither such rebound effect nor stereotyped responses were observed in mice receiving either high or low doses of JHW 007 before cocaine (see Supplementary data in Appendix A).

To evaluate the capacity of JHW 007 to modulate the sensitizing locomotor effects of subchronic cocaine, open field activity was studied. The protocol of drug administration matched the one used in the EPM paradigm. ANOVA was carried out with one between-subjects variable, Treatment, with four levels (four groups of treatment) and two within-subjects variable, Session, with two levels (two tests of locomotor activity) and Time, with six levels (6 bins per session, of 5 min each). ANOVA revealed a significant interaction between Treatment \times Session \times Time ($F_{15,200}=2.746$, $p=0.0007$). Acute administration of cocaine produced a robust increase in locomotor activity that was completely obliterated by pre-treatment with JHW 007 (Fig. 5). After subchronic exposure, cocaine produced locomotor sensitization that was manifested in the first 5–10 min as a strong boost of locomotor behaviour. However, subchronic administration of JHW 007 only produced a mild, not significant enhancement of locomotor activity. When JHW 007 was given prior to repeated cocaine, the BZT analogue did not prevent the locomotor effects of repeated cocaine, which were similar in strength and kinetics to those of acute cocaine treatment alone, but it blocked the sensitized component of the locomotor response induced by subchronic cocaine exposure (Fig. 5).

4. Discussion

The general aim of the current experiments was to characterize the effects of the BZT analogue, JHW 007, a high affinity DAT inhibitor, in preclinical models of cocaine addiction. The specific objectives were three-fold. First, we studied the rewarding effects of JHW 007 in the CPP paradigm and the ability of the BZT analogue to influence

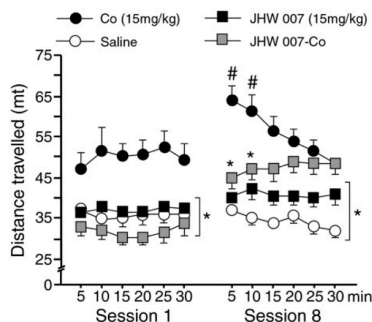


Figure 5 Effectiveness of the BZT analogue in modulating cocaine-induced locomotor sensitization in the open field. Acute cocaine, but not JHW 007, treatment evoked strong hyperactivity, which was totally prevented by prior JHW 007 treatment. Cocaine sensitization was evident as a strong increase in locomotor behaviour in the first 5–10 min of the re-test. Although JHW 007 did not prevent the locomotor effects of repeated cocaine, it did block the locomotor boost observed in cocaine-sensitized mice. Data represent means \pm SEM. *, significantly different from cocaine values ($p < 0.05$ by Newman–Keuls tests); #, significantly different from acute cocaine values at corresponding time points ($p < 0.05$ by Newman–Keuls tests).

cocaine-induced CPP. Second, we examined locomotor activity in mice undergoing drug conditioning to determine the effects of JHW 007 treatment alone and the interactions of the BZT analogue with cocaine. Third, we investigated anxiety-related behaviours and locomotor responses in the EPM following acute or subchronic exposure to JHW 007, cocaine and combinations of the BZT analogue and cocaine. Locomotor sensitization induced by the same treatments was also investigated in the open field in the absence, or near absence, of stressors. The results of these experiments highlighted important psychopharmacological differences between JHW 007 and cocaine, and demonstrated the ability of JHW 007 to neutralize some clinically-relevant behaviours typically induced by cocaine exposure.

The search for efficacious medications for cocaine addiction has long focused on the design of drugs that either act as a substitute for cocaine by inducing similar effects on dopamine neurotransmission or exert antagonistic actions by preventing the binding of cocaine to the DAT (Rothman, 1990; Gorelick et al., 2004). Efforts have concentrated on the identification of compounds that mimic the DAT-binding properties of cocaine but are less stimulating and act with a slower receptor onset and offset than cocaine. Several DAT inhibitors with such desirable pharmacological properties have been investigated in clinical trials but results have been modest so far (Grabowski et al., 1997; Preti, 2000). However, it is still believed that the design and investigation of molecules that interfere with the DAT in delayed and prolonged mode may lead to the discovery of useful medications for cocaine addiction (Rothman et al., 2008). BZT analogues are potent DA uptake inhibitors produced by specific chemical modifications on the parent BZT molecule (Newman and Katz, 2009). Several BZT analogues show pharmacokinetic/dynamic features that are consistent with those of an ideal replacement treatment for cocaine abuse

(Raje et al., 2005; Raje et al., 2002), do not exhibit cocaine-like behavioural effects (Katz et al., 1997) and even antagonize some of the behavioural effects of cocaine (Desai et al., 2005; Velázquez-Sánchez et al., 2009). The present results provided evidence that one such BZT analogue, JHW 007, lacked rewarding and stimulant effects in its own right but readily antagonized the rewarding and stimulant effects of cocaine. Previously, Desai et al. (2005) showed that JHW 007 produces a rate of DAT occupancy slower than that of cocaine and blocks the locomotor activity induced by acute cocaine challenge. In agreement with such data, the present findings confirmed and extended these observations to a situation in which mice undergoing drug conditioning received repeated challenges of cocaine after the administration of JHW 007. The BZT analogue consistently attenuated cocaine-induced locomotor stimulation throughout conditioning. Further, in a previous CPP experiment in rats, JHW 007 was able to induce CPP when administered 45 min but not 90 min or immediately before placement in the conditioning apparatus (Li et al., 2005). Our results in mice indicated that JHW 007 was devoid of rewarding effects in the CPP paradigm when administered 60 min prior to placement in the CPP chambers. Moreover, our results showed for the first time that JHW 007 prevented cocaine-induced CPP, as previously did AHN-1055, another BZT analogue (Velázquez-Sánchez et al., 2009). In addition to high affinity for the DAT, AHN-1055 exerts equipotent antagonistic effects at muscarinic M1 receptors. The finding that JHW 007 blocked the CPP evoked by cocaine suggests that the anticholinergic activity of AHN-1055 does not account in a significant way for its ability to similarly prevent cocaine-induced CPP. Therefore, interference with the DAT is probably sufficient to prevent the rewarding and stimulant effects of cocaine.

The EPM is a reliable method for screening anxiety responses in rodents (Walf and Frye, 2007; Lister, 1987). The anxiety-like profile of BZT analogues has not been investigated previously, nor have the interactions of BZT analogues with cocaine. While JHW 007 was dissimilar to cocaine in its capacity to provoke locomotor stimulation and conditioned reward, the dissociation from cocaine in the EPM test of anxiety was less evident. Both JHW 007 and cocaine, given acutely or subchronically, displayed an anxiogenic-like profile in the EPM, as did the combination of both compounds. Acute and repeated cocaine treatments have been shown previously to evoke anxiety-related behavioural effects in the EPM (Muller et al., 2008; Yang et al., 1992). Other stimulant drugs, such as amphetamine (Biala and Kruk, 2007) and caffeine (Jain et al., 2005), but not modafinil (Simon et al., 1994), exhibited anxiogenic-like activity in the EPM. The anxiogenic-like effects of cocaine and JHW 007 were most apparent following subchronic exposure, which produced marked avoidance of the open arms. Paradoxically, repeated treatment with low doses of the BZT analogue seemed to be more effective, as high doses produced variable responses and did not significantly reduce the time spent in the open arms. Despite these inconsistencies, both acute and chronic treatment with cocaine or JHW 007 unambiguously reduced head dipping, a visual screening of open platforms that is considered a risk-assessment manifestation associated with anxiety. Further, while JHW 007 showed the ability to block the rewarding and stimulant effects of cocaine in the CPP assays, the BZT analogue failed to alter cocaine-induced anxiety-related behaviours in the

EPM. This failure was most likely caused by the capacity of the BZT analogue to produce by itself anxiogenic-like effects, which may generally associate with enhanced DA neurotransmission (Moghaddam et al., 1990; McCullough and Salamone, 1992; Dazzi et al., 2001).

Measurements of locomotor behaviour provide a means for controlling the possible confounding influence of drug-induced changes in activity on anxiety-related behaviours. The results showed that the anxiogenic-like effects of JHW 007 and cocaine were largely independent of locomotor activity, which underwent significant change following acute and subchronic exposure. While both JHW 007 and cocaine treatments suppressed locomotor activity in the EPM after acute exposure, subchronic cocaine administration shifted the locomotor response from inhibition to strong stimulation. Such rebound effect of repeated cocaine exposure was not induced by repeated treatment with JHW 007, which only brought its acute suppressing acute effects back to baseline. Most significantly, JHW 007 nullified the rebound effects of subchronic cocaine, suggesting that the BZT analogue might effectively suppress some of the long-term effects of cocaine. To further examine this question, the same protocol of drug administration was used in an open field experiment, minimizing the stress conditions associated with the EPM task. The results showed that JHW 007 did not totally abolish the stimulant effects of repeated cocaine treatment, but it blocked the appearance of the sensitized locomotor component associated with subchronic cocaine exposure. This finding suggests that the BZT analogue might prevent some of the long-term untoward adaptations produced by cocaine treatment. Such possibility merits further investigation.

Recent homology modeling and molecular simulation studies have shed light over the neurobiological mechanisms by which BZT analogues may prevent the actions of cocaine. Such studies showed that dopamine binds to the DAT in a hydrophobic pocket situated between transmembrane domains 1, 3, 6 and 8 (Beuming et al., 2008; Huang and Zhan, 2007). Moreover, recognition sites for cocaine and D-amphetamine appeared to broadly overlap with that of the endogenous substrate, DA (Indarte et al., 2008; Beuming et al., 2008). Critically, some BZT derivatives, including JHW 007 and MFZ 2-71, also bind in the vestibule at a site overlapping with that of DA (Beuming et al., 2008). Therefore, the most straightforward explanation of the current data is that JHW 007 was able to counteract some of the actions of cocaine by preventing the binding of cocaine to its main molecular target in the brain, that is, the DAT.

In summary, the results presented demonstrated that the BZT analogue, JHW 007, was largely devoid of stimulant-like psychopharmacological characteristics. Most notably, the BZT analogue attenuated the stimulant, sensitizing and rewarding, but not the anxiogenic-like, effects of cocaine. These findings provide further support for the possible application of JHW 007, and of chemically related molecules, as substitute treatment for cocaine addiction.

Role of the funding source

Funding for this study was provided by Plan Nacional sobre Drogas (Spanish Ministry of Health) and the Instituto de Salud Carlos III (Network for Addictive Disorders, Spanish Ministry of Science and

Technology). These institutions had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

Contributors

Authors Clara Velázquez-Sánchez and Juan J. Canales designed the study and wrote the manuscript. Authors Clara Velázquez-Sánchez and Antonio Ferragud performed the experiments and analyzed the data. Authors Juan Murga and Miguel Cardá synthesized the BZT analogue. All authors contributed to and have approved the final manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

The study was supported by grants from Plan Nacional sobre Drogas (Spanish Ministry of Health) and the Instituto de Salud Carlos III (Network for Addictive Disorders, Red RTA, Spanish Ministry of Science and Technology). Clara Velázquez-Sánchez is a recipient of a graduate student contract from the Instituto de Salud Carlos III. The technical assistance of Agueda Ferrer, Gema Morant and Alexandra Arcusa is gratefully acknowledged.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.euroneuro.2010.03.005.

References

- Agoston, G.E., Wu, J.H., Izenwasser, S., George, C., Katz, J., Kline, R.H., et al., 1997. Novel N-substituted 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]tropine analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *J. Med. Chem.* 40, 4329–4339.
- Beuming, T., Kniazeff, J., Bergmann, M.L., Shi, L., Gracia, L., Raniszewska, K., et al., 2008. The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat. Neurosci.* 11, 780–789.
- Biala, G., Kruk, M., 2007. Amphetamine-induced anxiety-related behavior in animal models. *Pharmacol. Rep.* 59, 636–644.
- Dazzi, L., Spiga, F., Pira, L., Ladu, S., Vacca, G., Rivano, A., et al., 2001. Inhibition of stress- or anxiogenic-drug-induced increases in dopamine release in the rat prefrontal cortex by long-term treatment with antidepressant drugs. *J. Neurochem.* 76, 1212–1220.
- Desai, R.I., Kopajtic, T.A., Koffarnus, M., Newman, A.H., Katz, J.L., 2005. Identification of a dopamine transporter ligand that blocks the stimulant effects of cocaine. *J. Neurosci.* 25, 1889–1893.
- Ferragud, A., Velazquez-Sanchez, C., Hernandez-Rabaza, V., Nacher, A., Merino, V., Carda, M., et al., 2009. A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 207, 281–286.
- Gorelick, D.A., Gardner, E.L., Xi, Z.X., 2004. Agents in development for the management of cocaine abuse. *Drugs* 64, 1547–1573.
- Grabowski, J., Roache, J.D., Schmitz, J.M., Rhoades, H., Creson, D., Korszun, A., 1997. Replacement medication for cocaine dependence: methylphenidate. *J. Clin. Psychopharmacol.* 17, 485–488.

- Grabowski, J., Shearer, J., Merrill, J., Negus, S.S., 2004. Agonist-like, replacement pharmacotherapy for stimulant abuse and dependence. *Addict. Behav.* 29, 1439–1464.
- Hiranita, T., Soto, P.L., Newman, A.H., Katz, J.L., 2009. Assessment of reinforcing effects of benztrapine analogs and their effects on cocaine self-administration in rats: comparisons with monoamine uptake inhibitors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 329, 677–686.
- Huang, X., Zhan, C.G., 2007. How dopamine transporter interacts with dopamine: insights from molecular modeling and simulation. *Biophys. J.* 93, 3627–3639.
- Indarte, M., Madura, J.D., Surratt, C.K., 2008. Dopamine transporter comparative molecular modeling and binding site prediction using the LeuT(Aa) leucine transporter as a template. *Proteins* 70, 1033–1046.
- Jain, N.S., Hirani, K., Chopde, C.T., 2005. Reversal of caffeine-induced anxiety by neurosteroid 3- α -hydroxy-5- α -pregnane-20-one in rats. *Neuropharmacology* 48, 627–638.
- Karila, L., Gorelick, D., Weinstein, A., Noble, F., Benyamina, A., Coscas, S., et al., 2008. New treatments for cocaine dependence: a focused review. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 11, 425–438.
- Katz, J.L., Newman, A.H., Izenwasser, S., 1997. Relations between heterogeneity of dopamine transporter binding and function and the behavioral pharmacology of cocaine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 57, 505–512.
- Li, S.M., Newman, A.H., Katz, J.L., 2005. Place conditioning and locomotor effects of N-substituted, 4', 4"-difluorobenztrapine analogs in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 1223–1230.
- Lister, R.G., 1987. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)* 92, 180–185.
- McCullough, L.D., Salamone, J.D., 1992. Anxiogenic drugs beta-CCE and FG 7142 increase extracellular dopamine levels in nucleus accumbens. *Psychopharmacology (Berl)* 109, 379–382.
- Minozzi, S., Amato, L., Davoli, M., Farrell, M., Lima Reisser, A.A., Pani, P.P., et al., 2008. Anticonvulsants for cocaine dependence. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD006754.
- Moghaddam, B., Roth, R.H., Bunney, B.S., 1990. Characterization of dopamine release in the rat medial prefrontal cortex as assessed by in vivo microdialysis: comparison to the striatum. *Neuroscience* 36, 669–676.
- Muller, C.P., Carey, R.J., Wilkisz, M., Schwenzner, S., Jocham, G., Huston, J.P., et al., 2008. Acute anxiolytic effects of cocaine: the role of test latency and activity phase. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 218–226.
- Newman, A.H., Agoston, G.E., 1998. Novel benztrapine [3a-(diphenylmethoxy)tropane] analogs as probes for the dopamine transporter. *Curr. Med. Chem.* 5, 305–319.
- Newman, A.H., Katz, J.L., 2009. Atypical dopamine uptake inhibitors that provide clues about cocaine's mechanism at the dopamine transporter. *Top. Med. Chem.* 4, 95–129.
- Newman, A.H., Kulkarni, S., 2002. Probes for the dopamine transporter: new leads toward a cocaine-abuse therapeutic—a focus on analogues of benztrapine and rimcazole. *Med. Res. Rev.* 22, 429–464.
- Orson, F.M., Kinsey, B.M., Singh, R.A., Wu, Y., Kosten, T.R., 2009. Vaccines for cocaine abuse. *Hum. Vaccin.* 5, 194–209.
- Preti, A., 2000. Vanoxerine National Institute on Drug Abuse. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 1, 241–251.
- Raje, S., Dowling, T.C., Eddington, N.D., 2002. Determination of the benztrapine analog AHN-1055, a dopamine uptake inhibitor, in rat plasma and brain by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 768, 305–313.
- Raje, S., Cornish, J., Newman, A.H., Cao, J., Katz, J.L., Eddington, N.D., 2005. Pharmacodynamic assessment of the benztrapine analogues AHN-1055 and AHN-2005 using intracerebral microdialysis to evaluate brain dopamine levels and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. *Pharm. Res.* 22, 603–612.
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., Kuhar, M.J., 1987. Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237, 1219–1223.
- Rothman, R.B., 1990. High affinity dopamine reuptake inhibitors as potential cocaine antagonists: a strategy for drug development. *Life Sci.* 46, L17–L21.
- Rothman, R.B., Baumann, M.H., Prisinzano, T.E., Newman, A.H., 2008. Dopamine transport inhibitors based on GBR12909 and benztrapine as potential medications to treat cocaine addiction. *Biochem. Pharmacol.* 75, 2–16.
- Simon, P., Panissaud, C., Costentin, J., 1994. The stimulant effect of modafinil on wakefulness is not associated with an increase in anxiety in mice. A comparison with dexamphetamine. *Psychopharmacology (Berl)* 114, 597–600.
- Sofuoglu, M., Kosten, T.R., 2006. Emerging pharmacological strategies in the fight against cocaine addiction. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 11, 91–98.
- Tanda, G., Newman, A., Ebbs, A.L., Tronci, V., Green, J., Tallarida, R.J., et al., 2009. Combinations of cocaine with other dopamine uptake inhibitors: assessment of additivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 802–809.
- Velázquez-Sánchez, C., Ferragud, A., Hernandez-Rabaza, V., Nacher, A., Merino, V., Carda, M., et al., 2009. The dopamine uptake inhibitor 3-[bis(4'-fluorophenyl) methoxy]-tropane reduces cocaine-induced early-gene expression, locomotor activity, and conditioned reward. *Neuropsychopharmacology* 34, 2497–2507.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fowler, J.S., Gatley, S.J., Ding, Y.S., Logan, J., et al., 1996. Relationship between psychostimulant-induced "high" and dopamine transporter occupancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10388–10392.
- Volkow, N.D., Wang, G.J., Fischman, M.W., Foltin, R.W., Fowler, J.S., Abumrad, N.N., et al., 1997. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature* 386, 827–830.
- Volkow, N.D., Fowler, J.S., Wang, G.J., 1999. Imaging studies on the role of dopamine in cocaine reinforcement and addiction in humans. *J. Psychopharmacol.* 13, 337–345.
- Walf, A.A., Frye, C.A., 2007. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2, 322–328.
- Yang, X.M., Gorman, A.L., Dunn, A.J., Goeders, N.E., 1992. Anxiogenic effects of acute and chronic cocaine administration: neurochemical and behavioral studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 41, 643–650.

Therapeutic-like properties of a dopamine uptake inhibitor in animal models of amphetamine addiction

Clara Velazquez-Sanchez¹, Antonio Ferragud¹, Jaime Renau-Piqueras²
and Juan J. Canales¹

¹ Biopsychology & Comparative Neuroscience, Cavanilles Institute (ICBiBE), University of Valencia-FGUV, Valencia, Spain

² Cell Biology and Pathology, Research Centre, Hospital La Fe, Valencia, Spain

Abstract

N-substituted benztrapine (BZT) analogs are molecules that display high affinity for the dopamine transporter (DAT), therapeutic-like effects in animal models of cocaine abuse, and psychopharmacological characteristics consistent with those of a substitute medication for cocaine addiction. Since amphetamine (Amph) and cocaine share mechanisms of action at the DAT, we evaluated the effectiveness of a BZT analog in animal models of Amph addiction. We tested in mice and rats the effects of the BZT derivative, 3 α -[bis(4-fluorophenyl)methoxy]-tropane (AHN-1055), on Amph-induced conditioned place preference (CPP), locomotor activity, sensitization, self-administration and Δ FosB accumulation in the nucleus accumbens (NAc). The results showed that AHN-1055 did not produce rewarding, stimulant, or sensitized locomotor effects in mice when administered alone but it readily blocked the rewarding, stimulant, and sensitizing effects of repeated Amph exposure. Furthermore, in mice undergoing conditioning in the CPP paradigm, the BZT analog prevented the accumulation of Δ FosB protein induced in the NAc shell region by Amph treatment. Notably, treatment with AHN-1055 dose-dependently reduced Amph self-administration in rats with a steady history of voluntary Amph intake. These results provide a straightforward demonstration that a BZT derivative with binding affinity for DAT exhibits high efficacy in animal models of Amph abuse, suggesting that the novel generation of BZT analogs could have wider therapeutic applications in stimulant-spectrum disorders than those previously recognized.

Received 27 May 2010; Reviewed 15 July 2010; Revised 17 July 2010; Accepted 22 July 2010

Key words: Amphetamine, benztrapine analog, conditioned place preference, sensitization, self-administration.

Introduction

Amphetamine (Amph) is a potent psychoactive drug that produces euphoria and elevated alertness, wakefulness, and motivation by enhancing the activity of the central and peripheral nervous systems. Amph has some medicinal applications, currently being prescribed for the treatment of attention deficit hyperactivity disorder, narcolepsy and obesity (Dopheide & Pliszka, 2009; Fleckenstein *et al.* 2007; Nishino, 2007).

However, Amph is most often used for non-medical purposes due to its strong stimulant, rewarding and reinforcing properties. Among psychomotor stimulant drugs (a generic term that includes illicit substances such as cocaine, Amph and methamphetamine), Amph is one of the most commonly used worldwide. Recent surveys carried out in North America and Europe indicate that trends of trafficking and abuse of Amph and methamphetamine remain alarmingly high (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction, 2009; United Nations Office on Drugs and Crime, 2009). Notwithstanding these facts and trends, no specific medications are currently approved by the US Food and Drug Administration and the European Medicines Agency to treat addiction to Amph and Amph-related substances.

Address for correspondence: J. J. Canales, D.Phil., Biopsychology & Comparative Neuroscience Group, 'Cavanilles' Institute (ICBiBE), University of Valencia, Science Park, C/ Catedrático Beltrán, 2, Paterna, 46980 Valencia, Spain.
Tel.: 963 543 768 Fax: 963 543 670
Email: juan.canales@uv.es

Amph exerts behavioural and cognitive effects by modulating the activity of monoaminergic neurotransmitters. While several studies have shown that some of the effects of Amph are partially attributable to activation of norepinephrine and serotonin pathways (Rothman & Baumann, 2006; Sofuoglu & Sewell, 2009), there is a consensus that its stimulant and euphorogenic actions are mediated primarily by the dopamine (DA) system (Drevets *et al.* 2001; Lott *et al.* 2005). The neuronal mechanisms by which Amph increases DA concentrations have been studied extensively. Once Amph has entered into the cytosol of DA neurons, both via the dopamine transporter (DAT) and through diffusion across the cell membrane, it interacts with vesicular monoamine transporters to release endogenous stores of DA (Schmitz *et al.* 2001; Sulzer *et al.* 2005). The accumulation of cytosolic DA, which is further enhanced by the inhibitory effects of Amph on monoamine oxidase, then promotes the reverse transport of DA through the DAT (Robertson *et al.* 2009). An important aspect to consider is that recent observations indicate that DA, cocaine, and Amph all share overlapping binding sites at the DAT (Beuming *et al.* 2008; Indarte *et al.* 2008). However, recent studies have shown that the differential behavioural effects of cocaine and other uptake inhibitors may partially derive from variations in the mode of interaction with the DAT, producing different changes in the molecular conformation of DAT protein (Chen *et al.* 2004; Loland *et al.* 2008). Thus, molecules that might interact with the DAT to impede the actions of Amph and cocaine at the DAT without producing by themselves psychomotor stimulant-like effects could serve as potential medications for stimulant abuse.

N-substituted benzotropine (BZT) analogs are rationally designed, high-affinity DA uptake inhibitors with such desirable properties (Agoston *et al.* 1997; Katz *et al.* 2001). BZT derivatives bind in the vestibule at a site within the DAT overlapping with that of DA (Beuming *et al.* 2008), thereby blocking uptake and potentially interfering with the same binding site targeted by cocaine and Amph at the DAT. Additionally, BZT analogs show neurochemical properties consistent with that of a replacement medication for stimulant abuse. Some BZT derivatives exhibit rates of DAT occupancy slower than that of cocaine (Desai *et al.* 2005) and provoke slow and sustained increases in extracellular DA levels (Raje *et al.* 2002, 2005; Tanda *et al.* 2009). Moreover, several of these compounds have been shown to lack cocaine-like properties. BZT analogs do not readily evoke locomotor stimulant, rewarding and reinforcing effects (Hiranita *et al.* 2009; Katz *et al.* 2001)

and have, additionally, the ability to block most cocaine-related behaviours, including reward and self-administration (Ferragud *et al.* 2009; Velazquez-Sanchez *et al.* 2009).

Given that interference with the DAT largely accounts for the psychostimulant effects of cocaine and Amph, we tested the hypothesis that BZT analogs could be effective in animal models of Amph abuse. Here, we used 3 α -[bis(4-fluorophenyl)methoxy]-tropane (AHN-1055), a relatively inert BZT analog with similar affinity for DAT and muscarinic M₁ receptors, and with therapeutic-like properties in models of cocaine abuse (Ferragud *et al.* 2009; Velazquez-Sanchez *et al.* 2009). We used neurochemical and behavioural assays in which AHN-1055 was given alone and in combination with Amph to gain insight into the possible application of BZT derivatives as pharmacotherapies for Amph addiction.

Materials and methods

Subjects

Male Swiss OF-1 mice ($n=144$, Charles River, Spain), aged 5–6 wk and weighting 22–26 g, and male Long Evans rats ($n=29$, colony based at the Servei Central de Suport a la Investigació Experimental, Spain) aged 8–10 wk and weighting 250–300 g, served as subjects. Rats and mice were allowed to acclimatize for at least 1 wk prior to any experimental manipulation. Mice were housed in groups of four and rats were housed individually after surgery. The housing rooms were maintained under standard conditions of temperature ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) and humidity (45–55%) and were kept on a reversed 12-h light/dark cycle (lights on 21:00 hours). Mice were given food and water *ad libitum* and rats were given 20 g of rodent chow per day with free access to water. All experiments were performed in accordance with current European directives regulating animal experimentation (86/609/ECC) and were approved by the Ethical Committee (Faculty of Pharmacy) of the University of Valencia.

Pharmacological treatments

AHN-1055 was synthesized as described previously (Agoston *et al.* 1997; Ferragud *et al.* 2009). Purity of the product was assessed by magnetic resonance and was found to exceed 98%. AHN-1055 was dissolved in 0.9% saline, sonicated for complete solubilization and injected at doses of 0, 3, and 10 mg/kg i.p. in mice and at doses of 0, 5 and 10 mg/kg i.p. in rats. Dosage of the BZT analog was based on previous experiments

(Velazquez-Sanchez *et al.* 2009). Amph sulphate (Sigma-Aldrich, UK) was dissolved in 0.9% saline and injected at doses of 0, 0.5, and 4 mg/kg i.p. in mice. Low and high doses of Amph were deliberately chosen to examine potential up-shift/down-shift effects of the BZT analog on Amph-induced responses. In the self-administration assays Amph was available at a dose of 0.1 mg/kg per infusion in 100 μ l (Cain *et al.* 2008).

Surgery

For the intravenous self-administration experiments, rats were anaesthetized with Avertin (2,2,2-tribromoethanol, 12.5 mg/ml, in 2.5% tertiary amyl alcohol, 2 ml/100 g of body weight), and catheters (o.d. 0.63 mm, i.d. 0.30 mm, Camcaths, UK) were implanted into the right jugular vein, exiting dorsally between the scapulae. Rats were treated post-surgically with daily injections of antibiotic (Baytril[®], 10 mg/kg s.c.; Bayer, Germany) for 7 d. Catheters were flushed with heparinized saline (0.1 ml, 70 IU/ml) before and after each self-administration session.

Behavioural assays

Conditioned place preference (CPP) was carried out in chambers made of Perspex as described previously (Velazquez-Sanchez *et al.* 2009). The CPP procedure consisted of three phases: pre-conditioning, conditioning, and post-conditioning. During pre-conditioning, mice were habituated to the apparatus for 15 min on 2 consecutive days, the last of which (pre-conditioning session) was taken as baseline. The behaviour of the mice in the CPP apparatus was monitored using a video-tracking system (Viewpoint 2.5, France) that provided automated measures of time spent in each compartment and distance travelled, providing estimations of preference and locomotor activity, respectively. Mice that spent more than 70% of the time in one of the compartments during baseline ($n=15$) were excluded from the study. Mice were assigned to nine experimental groups ($n=9-13$ per group) receiving saline or AHN-1055 (3 and 10 mg/kg) as a pretreatment followed by saline or Amph (0.5 and 4 mg/kg) 60 min later. Conditioning was performed over 8 consecutive days, alternating drug sessions with control sessions in which mice received saline injections. During conditioning, the drug treatments were administered and the mice were placed individually into the drug-paired compartment for 30 min. Treatments and compartments (decorated with either circles or stripes) were counterbalanced. The

post-conditioning session was performed 24 h after the last conditioning session. Mice were placed in the CPP apparatus in a drug-free state and were allowed to explore it for 15 min with the guillotine doors removed. The time spent in each of the compartments was recorded. The change induced by the treatments in the preference for one compartment or the other (pre-conditioning *vs.* post-conditioning tests) was estimated as the ratio between the percentage of time spent in the drug-paired compartment and the time spent in the vehicle-paired compartment (Hernandez-Rabaza *et al.* 2008; Velazquez-Sanchez *et al.* 2009). Animals were sacrificed 60 min after the test session and the brains were used for immunocytochemistry.

The sensitization and stereotypy assays were performed in Perspex boxes (53 \times 28 \times 15 cm). Mice were habituated to the apparatus for 30 min the day before the assays began. Mice were distributed into four experimental groups ($n=6$ per group) and received saline or AHN-1055 (10 mg/kg i.p.) for 4 consecutive days as a pretreatment followed 60 min later by challenge with saline or Amph (4 mg/kg i.p.). Mice were monitored with a video-tracking system (Viewpoint 2.5, France) for 20 min. Two trained observers blind to the experimental treatments took measures of stereotyped behaviour using a rating scale (Velazquez-Sanchez *et al.* 2009) 10 and 20 min after the challenge with saline or Amph.

Rats ($n=6-8$ per group) were trained to lever-press in operant chambers (Panlab S.L., Spain) for Amph infusions (0.1 mg/kg per infusion in 100 μ l/5 s). Operant boxes were fitted with two retractable levers serving as active and inactive levers in a counterbalanced fashion. Active lever presses resulted in infusions of saline or Amph, illumination of a stimulus light for 5 s and retraction of the levers for 30 s. Inactive lever presses had no programmed consequences. Rats were trained on a fixed-ratio (FR1) schedule of reinforcement for 1-h sessions (Ferragud *et al.* 2009). Priming injections of Amph were never given. Pretreatments with the BZT analog were introduced only when rats had attained consistent levels of Amph self-administration. The criteria for stability were: days of training >10 , number of responses in active lever >10 per session, and inter-session variation $<20\%$ in the last three sessions before the tests. When the criteria were achieved, saline or AHN-1055 (5 or 10 mg/kg i.p.) injections were administered in a counterbalanced fashion 60 min prior to Amph intake tests. To prevent carry-over effects and/or cumulative effects of the BZT analog, rats were exposed to one of the two AHN-1055 doses, counterbalanced with saline injections.

Immunocytochemistry and microscopy

Mice used in the CPP experiment were perfused under pentobarbital anaesthesia (100 mg/kg i.p.) with 0.9% saline followed by paraformaldehyde in phosphate buffer 75 min after the post-conditioning test was performed. Brains were removed, post-fixed and cut in 35- μ m coronal sections on a cryostat. Sections were treated with 3% H₂O₂ to block endogenous peroxidase for 10 min and with 5% normal goat serum for 30 min. Samples were incubated with Δ FosB antibody (1:500, Santa Cruz Biotechnology, USA) overnight at room temperature and exposed to secondary antibody (goat anti-rabbit IgG 1:400, Vector Laboratories, USA) and to HRP-conjugated streptavidin (1:5000, Vector Laboratories, USA). Tissue was reacted with diaminobenzidine-H₂O₂ complex with nickel intensification (NiSO₄) to produce a nuclear black reaction. Sections were mounted onto slides, dried, dehydrated and topped with coverslips. Analysis was analogous to that described previously (Velazquez-Sanchez et al. 2009). High resolution photomicrographs of the shell and core of nucleus accumbens (NAc) were taken at 40 \times with an optical microscope (Nikon Eclipse E800). Digital photographs were taken and equalized using the corpus callosum as a blank and analysed with image analysis software (Image Tool, UTHSCSA). To obtain an average density at least four sections were studied for each subject. Sections ranging from 1.10 mm to 1.35 mm rostral to bregma (Paxinos & Franklin, 2001) were included in the analysis. Two counting frames were used for each of the sections analysed, one for the core and one for the shell subregions. The position of the frame remained constant in the core and ventromedial shell of NAc using the anterior commissure as a reference, as shown in Fig. 3b. The counting frame was 0.07 mm² for all areas examined. Threshold intensity was controlled manually within a constant range to eliminate background stain. Δ FosB-positive cells were counted by an observer blind to the treatments and the results were expressed as cell density (cells/mm²) in each of the regions studied.

Statistical analysis

Parametrical data were analysed by ANOVA followed Student Newman-Keuls (NK) *post-hoc* tests using the sampling error from the overall ANOVA as denominator. For the analysis of non-parametric observations, we used the procedure of Conover & Iman (1981) involving rank transformations followed by ANOVA (Velazquez-Sanchez et al. 2009) followed *post-hoc* comparisons. Statistical significance was established at $\alpha=0.05$ per experiment.

Results

AHN-1055 blocks reward, hyperlocomotion and neural adaptations induced by Amph conditioning

To test the ability of AHN-1055 to block the rewarding effects of the Amph we used a CPP procedure. ANOVA was performed with treatment as a between-subjects variable, with nine levels (nine experimental groups) and conditioning as a within-subjects variable, with two levels (pre-conditioning and post-conditioning). ANOVA indicated a significant treatment \times conditioning interaction ($F_{8,9}=2.264$, $p=0.0292$). There were no significant differences between experimental groups in the baseline levels of preference for one compartment or the other. *Post-hoc* analysis revealed that Amph exposure produced significant CPP only at the high dose ($p<0.05$ by NK test) whereas AHN-1055 treatment did not produce any preference or aversion at any dose, as reported previously (Velazquez-Sanchez et al. 2009). Remarkably, pretreatment with AHN-1055 dose-dependently blocked the preference induced by 4 mg/kg Amph (Fig. 1). Locomotor activity was measured during the drug conditioning sessions. ANOVA for locomotor activity counts (i.e. distance travelled) was performed with treatment as a between-subjects variable, with nine levels (nine groups of treatment) and session as a within-subjects variable, with four levels (4 d of drug administration). ANOVA showed a significant effect of the treatment variable ($F_{8,90}=32.348$, $p<0.0001$) and a significant treatment \times session interaction ($F_{8,270}=2.945$, $p<0.0001$). Amph potently induced locomotor activity at the high dose ($p<0.05$ by NK test), while the low dose was ineffective. Pretreatment with the high dose of AHN-1055 significantly attenuated Amph-induced hyperactivity ($p<0.05$ by NK test). Such attenuation ranged from 45% to 60% across the four sessions of Amph conditioning (Fig. 2).

In order to examine the neural mechanisms underlying the ability of the BZT analog to prevent the rewarding and stimulant effects of repeated Amph treatment mice were sacrificed after the conditioning test and Δ FosB accumulation in the NAc was quantified (Fig. 3). Amph increased Δ FosB expression in NAc core ($F_{3,32}=7.302$, $p=0.0007$, $p<0.05$ by NK test) and NAc shell ($F_{3,31}=9.439$, $p=0.0001$, $p<0.05$ by NK test) after 4 d of treatment. There was a tendency for the BZT analog to inhibit the constitutive expression of Δ FosB in the shell region when administered alone ($p<0.10$ by NK test). In parallel with the behavioural observations, pretreatment with AHN-1055 attenuated Amph-induced Δ FosB accumulation in the NAc. Such decrease was significant in

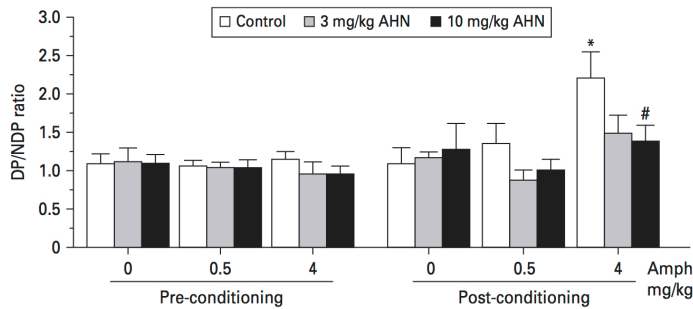


Fig. 1. Effects of AHN-1055 (3 and 10 mg/kg) and interactions with Amph (0.5 and 4 mg/kg) on the conditioned place preference (CPP) paradigm. AHN-1055 did not produce conditioning at any dose, while Amph did so only at the high dose. When given as a pretreatment, the benztropine analog dose-dependently blocked the CPP induced by Amph treatment. * Indicates significant differences from control values ($p < 0.05$ by NK test); # indicates significant variations from Amph (4 mg/kg) values ($p < 0.05$ by NK test after ANOVA). Data are expressed as means (\pm S.E.M.). DP/NDP, drug paired/non-drug paired.

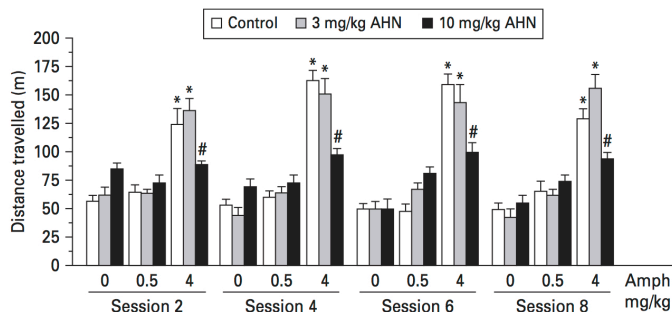


Fig. 2. Locomotor activity induced by AHN-1055 (3 and 10 mg/kg), Amph (0.5 and 4 mg/kg), and combinations thereof, during drug conditioning sessions. AHN-1055 did not produce significant effects on locomotor activity, whereas Amph (4 mg/kg) produced strong increases during the 4 d of treatment. Pretreatment with a high dose of AHN-1055 significantly attenuated the hyperlocomotion induced by Amph exposure across all sessions. * Indicates significantly different from control values; # indicates significantly different from Amph (4 mg/kg) values ($p < 0.05$ by NK test after ANOVA). Data represent means (\pm S.E.M.).

the shell region, reaching 62% ($p < 0.05$ by NK test) (Fig. 3).

AHN-1055 prevents Amph-induced locomotor sensitization

Amph is known for its ability to induce sensitization to its own locomotor stimulant effects (Pierce & Kalivas, 1997). To determine whether pretreatment with AHN-1055 would influence the expression of Amph sensitization, mice were exposed to daily injections of Amph and locomotor stimulation was measured. Concurrently, measures of stereotyped behaviour were taken to control for the induction of motor responses typically associated with excessive dopaminergic

stimulation. ANOVA was performed with two between-subjects variables. We calculated ANOVA for locomotor activity counts (i.e. distance travelled) with treatment as a between-subjects factor, with four levels (four experimental groups) and session as a repeated-measures variable, with four levels (4 d of drug administration). ANOVA yielded a significant treatment \times session interaction ($F_{27,180} = 1.704$, $p = 0.022$). Repeated exposure to AHN-1055 did not induce significant overall variations in locomotor activity across the 4 d of treatment. On the contrary, Amph injections gradually enhanced hyperactivity as treatment progressed, producing a fast-onset, significantly increased boost of locomotor behaviour compared to values corresponding to acute (i.e. session 1) Amph

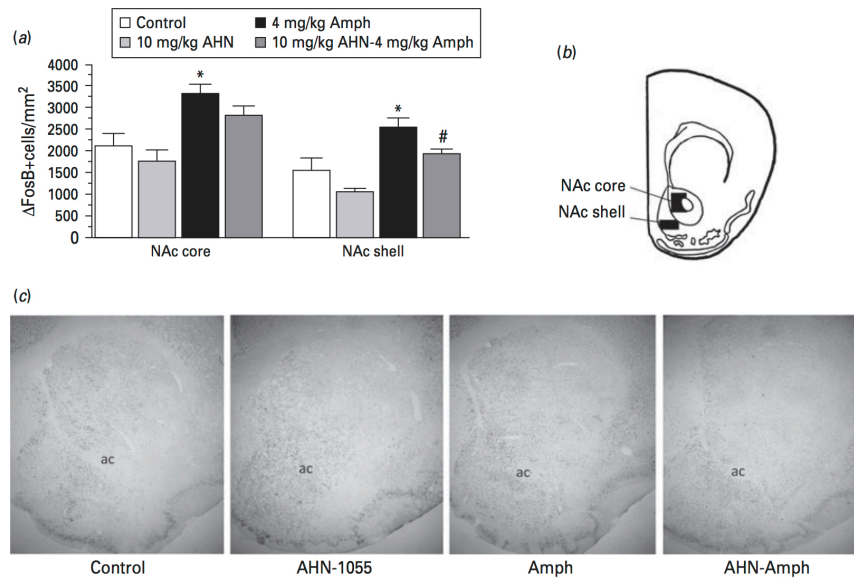


Fig. 3. Interactions of AHN-1055 with Amph on Δ FosB accumulation in the nucleus accumbens (NAc) of mice following conditioning. (a) Repeated treatment with AHN-1055 during conditioning did not increase Δ FosB expression in the NAc. By contrast, Amph produced significant accumulation in both the core and shell subregions. Notably, the benzotropine analog attenuated the build-up of Δ FosB protein induced by Amph conditioning. Such decrease was statistically significant in the shell region. (b) Diagram indicating the regions considered for quantification within the NAc. (c) Digital photomicrographs ($10\times$) of Δ FosB expression in the NAc from representative mice treated with the different drug combinations. * Indicates significantly different from control values; # indicates significantly different from Amph (4 mg/kg) values ($p < 0.05$ by NK test). Data in panel (a) are expressed as means (\pm S.E.M). ac, Anterior commissure.

treatment. Amph-induced locomotor activity was blocked by AHN-1055 treatment throughout the experiment, including such sensitized components (Fig. 4a).

Stereotyped behaviours were measured after the administration of the drug treatments. ANOVA was performed on the ranked data with treatment as a between-subjects factor, with four levels (four experimental groups) and session as a repeated-measure variable, with four levels (4 d of drug administration). The analysis revealed a significant treatment \times session interaction ($F_{9,60} = 11.0974$, $p < 0.0001$). Amph treatment produced robust motor stereotypy that increased with repeated exposure. It should be noted that the expression of stereotypy was not incompatible with the simultaneous induction of sensitized locomotor activity, as noted previously in mice (Velazquez-Sanchez et al. 2009). Amph-induced stereotypy consisted mainly of the repetitive selection of running paths (Bonasera et al. 2008), which did not interfere with the expression of locomotor sensitization. Pretreatment with AHN-1055 induced a mild,

but significant increase in stereotypy. At a dose of 10 mg/kg, AHN-1055 did not appear to attenuate significantly the motor stereotypy-induced repeated Amph treatment (Fig. 4b).

AHN-1055 dose-dependently blocks Amph self-administration

To investigate the effects of AHN-1055 on Amph intake, rats with a stable history of Amph consumption were treated with the analog 60 min prior to self-administration session. Rats achieved highly consistent levels of self-administration performance during the training phase. ANOVA for number of reinforcements during this period (i.e. reinforced active lever presses) was calculated with treatment as a between-subjects factor, with four levels (two experimental groups and two control groups) and session as a within-subjects variable, with ten levels (number of self-administration sessions). ANOVA indicated a main effect of the treatment ($F_{3,225} = 79.552$, $p < 0.0001$)

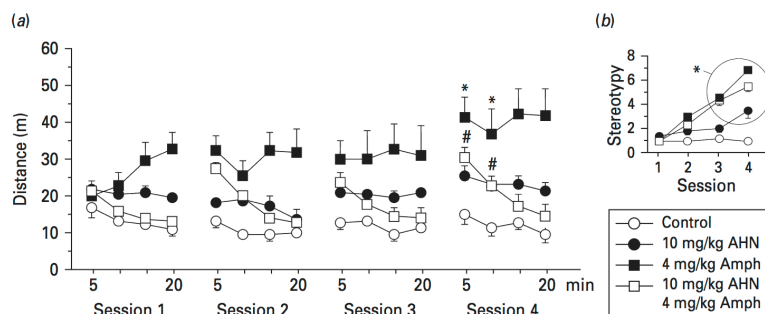


Fig. 4. Locomotor sensitization induced by Amph treatment and modulation by AHN-1055. AHN-1055 blocked the hyperstimulation and sensitization induced by repeated Amph exposure. (a) Amph sensitization progressively built-up across the 4 d of treatment and was apparent as an early boost of locomotor stimulation. (b) Amph treatment produced robust stereotypy, whereas AHN-1055 treatment did so only mildly. The benztropine analog did not significantly attenuate Amph-induced stereotypy. * Indicates differences from values for Amph at corresponding time-points in session 1 ($p < 0.05$ by NK test after ANOVA); # indicates significantly different from Amph (4 mg/kg) values ($p < 0.05$ by NK test). Data in panels (a) and (b) are means (\pm S.E.M.).

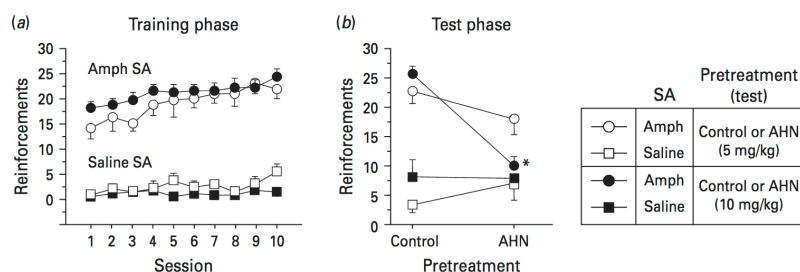


Fig. 5. Inhibitory effects of AHN-1055 on Amphetamine self-administration (SA). (a) Rats showed a stable pattern of Amphetamine intake during the training phase of self-administration. (b) When rats reached criterion, they were exposed to the benztropine analog before the self-administration tests. AHN-1055 dose-dependently blocked Amphetamine intake. * Significantly different from control pretreatment ($p < 0.05$ by NK test after ANOVA). Data in panels (a) and (b) represent means (\pm S.E.M.).

(Fig. 5a). Following training, the treatments with the BZT analog (5 or 10 mg/kg i.p.) were introduced in a counterbalanced fashion. For data obtained during the test phase, ANOVAs were performed with treatment as a between-subjects factor, with two levels (saline or Amph) and test as a within-subjects variable, with two levels (saline or AHN-1055). Data showed that pretreatment with the BZT derivative dose-dependently blocked Amphetamine self-administration (Fig. 5b). The reduction was significant at the high dose of AHN-1055 ($F_{1,11} = 14.985$, $p = 0.0026$, $p < 0.05$ by NK test).

Discussion

The aim of the present experiments was to evaluate the therapeutic-like effects of a DAT inhibitor with low

abuse liability in animal models of Amphetamine addiction. We used a variety of clinically relevant animal models, including locomotor stimulation, sensitization, reward, and self-administration. The data showed that AHN-1055, a high-affinity DAT inhibitor, prevented the expression of key Amphetamine-related behaviours. The novel observations presented provide a clear demonstration that the new generation of BZT derivatives may be useful leads for the development of future medications for addiction to Amphetamine, and Amphetamine-related drugs that share activity at the DAT.

Great efforts have been made over the last 20 yr to develop substances with therapeutic applications in stimulant abuse. Albeit psychomotor stimulants alter central norepinephrine and serotonin transmission, it is accepted that their reinforcing and euphorogenic

effects are principally mediated by the DA system. The ability of cocaine-like drugs to maintain self-administration is correlated with their binding affinity for the DAT (Ritz *et al.* 1987). In humans, the induction of self-reported euphoria is a function of DAT occupancy by cocaine (Volkow *et al.* 1996). Thus, the majority of the newly synthesized, potentially therapeutic agents have been designed to target the DAT to either 'antagonize' the actions of stimulants at the DAT or act as a substitute by 'normalizing' DA neurotransmission after chronic stimulant abuse (Gorelick *et al.* 2004; Rothman, 1990). The concept of 'agonist' or replacement medication for stimulant abuse based on DAT interference is supported by the existence of a number of DAT inhibitors whose pharmacokinetic/dynamic and behavioural profile clearly differs from that of cocaine. From a therapeutic standpoint, features that are desirable for a DAT inhibitor include slow rate of penetration into the brain, slow receptor onset and offset, prolonged psychopharmacological action and weak reinforcing efficacy. Some new BZT derivatives exhibit neurochemical and behavioural characteristics that are fitting with such desired low abuse profile (Newman & Kulkarni, 2002; Rothman *et al.* 2008).

BZT analogs, including AHN-1055, have been evaluated in preclinical models of cocaine addiction, with promising results (Desai *et al.* 2005; Ferragud *et al.* 2009; Hiranita *et al.* 2009; Velazquez-Sanchez *et al.* 2009, 2010), but their possible effectiveness in models of Amph addiction have not been investigated until now. We first studied the effects of BZT analog treatment on the rewarding, stimulant and sensitizing effects of Amph. As shown previously, AHN-1055 was largely devoid of strong stimulant, sensitizing and rewarding effects (Li *et al.* 2005; Velazquez-Sanchez *et al.* 2009). As predicted, AHN-1055 blocked Amphi-induced CPP and significantly attenuated Amphi-induced locomotor activity. When we administered Amph on a daily basis, it produced a progressive increment in locomotor behaviour. Such sensitized behavioural responses were also blocked the BZT analog. The fact that AHN-1055 did not potentiate Amphi-induced motor stereotypy suggests that the blocking effects of the BZT analog on locomotor activity and CPP were unlikely to result from the induction of excessive psychomotor effects or potentially interfering behavioural responses. It is more reasonable to assume that AHN-1055 prevented at least some of the persistent neuroadaptations associated with Amph reward and sensitization. We attempted to uncover some of the neuronal mechanisms responsible for the ability of the BZT derivative to block the

behavioural effects of Amph. Previous data indicated that AHN-1055 blocked cocaine-induced c-Fos protein expression in the NAc in mice undergoing conditioning. However, in the present experiments, mice were submitted to Amph conditioning and were later tested for CPP. Thus we used Δ FosB accumulation, instead of c-Fos induction, as a read-out of brain activity. Δ FosB accumulates in the NAc following repeated exposure to motor stimulants (Hope *et al.* 1994) and such protein build-up enhances sensitivity to the rewarding effects of both natural and drug rewards, and increases motivation to seek them (Kelz *et al.* 1999; McClung & Nestler, 2003; Olausson *et al.* 2006). Interestingly, repeated AHN-1055 treatment failed to produce Δ FosB accumulation in the NAc, thus differing from other DAT blockers such as cocaine and methylphenidate, which do induce accumulation of the protein (Hope *et al.* 1994; Kim *et al.* 2009). Furthermore, the BZT analog markedly reduced Δ FosB expression after Amph conditioning. Such effect was most evident in the shell region of the NAc, which is, by virtue of connections with the hypothalamus and the ventral tegmental area, a key nodal point of the limbic circuitry that subserves appetitive behaviour, viscerio-endocrine responses and the unconditioned effects of motivationally salient stimuli, including drugs of abuse (Kelley, 1999; Meredith *et al.* 2008). Our data suggest that one of the mechanisms by which AHN-1055 prevents the behavioural effects of Amph is by interference with the changes of gene expression that accompany repeated drug exposure. Such changes in gene expression are probably secondary to the pharmacological interactions of AHN-1055 and Amph, which probably result in reduced entry of Amph into the cytosol and decreased DA efflux through reverse transport.

When examining the blocking effects of AHN-1055 on Amph-induced CPP, we must consider that other factors, in addition to reward, could be implicated. Place conditioning requires the simultaneous processing of the unconditioned stimulus (i.e. the drug), the formation of a cognitive representation of the context in which conditioning takes place, the association between the drug and the contextual representation, and the long-term memory of such association (Tzschentke, 2007). AHN-1055, unlike the majority of addictive drugs, failed to induce CPP when administered alone. Similarly, there was no conditioning when the BZT analog was administered prior to Amph. The data do not allow us to establish whether AHN-1055 blocked Amph-induced reward, or instead interfered with some of the aforementioned learning processes. Yet, the strong association that exists between Δ FosB expression in the NAc and sensitivity to drug-induced

and natural reward (McClung & Nestler, 2003; Olsson *et al.* 2006) favours the hypothesis that AHN-1055 blocked Amph reward, although further investigation is warranted.

Having shown therapeutic-like effects of AHN-1055 in models of Amph reward and psychomotor stimulation, we next probed whether the BZT analog could act as a replacement treatment in an animal model of Amph self-administration. Previous observations indicated that a range of BZT analogs, including AHN-1055, retain in some measure cocaine-like discriminative properties, substituting for cocaine only partially (Katz *et al.* 1999, 2001). Self-administration of AHN-1055 is less robust than self-administration of cocaine, and does not seem to generate context-induced drug-seeking after abstinence (Ferragud *et al.* 2009), thus suggesting that the BZT analog has low abuse liability. Further, Ferragud *et al.* (2009) reported that AHN-1055 dose-dependently reduced cocaine self-administration. In the present experiments, acute treatment with the BZT analog reduced Amph intake in a dose-dependent manner in rats with solid training in Amph self-administration. Thus AHN-1055 did not behave as an antagonist in this model. In animal models of stimulant self-administration, DA receptor antagonists typically cause a shift in the dose-response curve to the right, increasing responding as a means to compensate for the reduced subjective value of the self-administered stimulant (Ahmed & Koob, 2004; Koob *et al.* 1987; Phillips *et al.* 1994). Although we did not control for intoxicating or stereotypy-inducing effects of AHN-1055 in the current experiments, we consider it unlikely that the pharmacological regimen to which the rats were subjected interfered with the task. A similar treatment with AHN-1055 did not reduce, but rather increased, lever presses for sucrose reinforcement (Ferragud *et al.* 2009), making it unlikely that the BZT analog caused motoric impairments hampering the operant task. By contrast, AHN-1055 significantly reduced the intake of Amph, suggesting that to some extent the BZT analog substituted for Amph, in spite of exhibiting behavioural characteristics that are clearly distinct from Amph, cocaine and other DAT inhibitors, such as nomifensine (Ferragud *et al.* 2009; Velazquez-Sanchez *et al.* 2009).

AHN-1055 is an antagonist at muscarinic M₁ receptors and therefore we cannot rule out that actions at these receptors could partially account for the behavioural effects observed in the Amph interaction assays. However, most current evidence would argue against this possibility. M₁ receptor deficiency leads to elevated dopaminergic transmission and heightened

locomotor response to Amph, suggesting that tonic M₁ receptor activation opposes, rather than facilitates, DA actions (Gerber *et al.* 2001). Furthermore, the selective M₁ antagonist, MT-7, did not alter the motor responses to Amph (Wirtshafter, 2006). In addition, data with the DAT inhibitor, JHW007, which exhibits much weaker relative affinity for M₁ receptors, suggest that antagonistic actions at these receptors are not required to prevent cocaine-induced reward and locomotor stimulation (Velazquez-Sanchez *et al.* 2010). However, the anticholinergic profile of some BZT derivatives should be investigated further in relation to their potential as pharmacotherapies for stimulant addiction.

The further development and evaluation of BZT-related analogs is important and timely. The use of medications that could act as functional antagonists under conditions of high dopaminergic tone and as agonists under conditions of DA depletion would represent a major advancement in the management of stimulant addiction. Such medications could act as antagonists when DA tone is elevated during active drug-seeking and taking (e.g. following cocaine or Amph intake), thus serving as detoxifying agents. On the other hand, they could serve as agonists when DA tone is low during abstinence (i.e. hypodopaminergia associated with stimulant withdrawal) by blocking uptake and 'normalizing' DA transmission, thus reducing the likelihood of relapse. In animal models of cocaine addiction AHN-1055 has shown properties that are consistent with such a profile. The results of the current experiments widen the spectrum of the possible therapeutic applications of novel DAT inhibitors in stimulant abuse. We provide the first demonstration that a BZT analog such as AHN-1055 shows characteristics that are unlike Amph in models of drug-induced reward, locomotor stimulation, sensitization and gene expression, and exhibits therapeutic-like properties by blocking both Amph-related behaviours and key plasticity changes that accompany chronic stimulant exposure. These features are all much sought after in a dual agonist/antagonist medication for stimulant abuse.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Plan Nacional Sobre Drogas (grant PNSD2008-057, Spanish Ministry of Health), and Red de Trastornos Adictivos (grants RD06/0001/0032 and RD06/0001/0009, RETICS, Instituto de Salud Carlos III). C.V.-S. is in receipt of a graduate student contract from Red de Trastornos Adictivos (RETICS, Instituto de Salud

Carlos III). The authors thank Agueda Ferrer for technical assistance.

Statement of Interest

None.

References

- Agoston GE, Wu JH, Izenwasser S, George C, et al. (1997). Novel N-substituted 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)-methoxy]tropane analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *Journal of Medicinal Chemistry* **40**, 4329–4339.
- Ahmed SH, Koob GF (2004). Changes in response to a dopamine receptor antagonist in rats with escalating cocaine intake. *Psychopharmacology (Berlin)* **172**, 450–454.
- Beuming T, Kniazeff J, Bergmann ML, Shi L, et al. (2008). The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nature Neuroscience* **11**, 780–789.
- Bonasera SJ, Schenk AK, Luxenberg EJ, Tecott LH (2008). A novel method for automatic quantification of psychostimulant-evoked route-tracing stereotypy: application to *Mus musculus*. *Psychopharmacology (Berlin)* **196**, 591–602.
- Cain ME, Denehy ED, Bardo MT (2008). Individual differences in amphetamine self-administration: the role of the central nucleus of the amygdala. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1149–1161.
- Chen N, Zhen J, Reith ME (2004). Mutation of Trp84 and Asp313 of the dopamine transporter reveals similar mode of binding interaction for GBR12909 and benztropine as opposed to cocaine. *Journal of Neurochemistry* **89**, 853–864.
- Conover WJ, Iman RL (1981). Rank transformations as a bridge between parametric and non-parametric statistics. *American Statistician* **35**, 124–129.
- Desai RI, Kopajtic TA, Koffarnus M, Newman AH, et al. (2005). Identification of a dopamine transporter ligand that blocks the stimulant effects of cocaine. *Journal of Neuroscience* **25**, 1889–1893.
- Dopheide JA, Pliszka SR (2009). Attention-deficit-hyperactivity disorder: an update. *Pharmacotherapy* **29**, 656–679.
- Drevets WC, Gautier C, Price JC, Kupfer DJ, et al. (2001). Amphetamine-induced dopamine release in human ventral striatum correlates with euphoria. *Biology Psychiatry* **49**, 81–96.
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2009). *Annual Report. The State of the Drugs Problem in Europe*. Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Ferragud A, Velazquez-Sanchez C, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, et al. (2009). A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berlin)* **207**, 281–289.
- Fleckenstein AE, Volz TJ, Riddle EL, Gibb JW, et al. (2007). New insights into the mechanism of action of amphetamines. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **47**, 681–698.
- Gerber DJ, Sotnikova TD, Gainetdinov RR, Huang SY, et al. (2001). Hyperactivity, elevated dopaminergic transmission, and response to amphetamine in M1 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**, 15312–15317.
- Gorelick DA, Gardner EL, Xi ZX (2004). Agents in development for the management of cocaine abuse. *Drugs* **64**, 1547–1573.
- Hernandez-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, et al. (2008). The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward. *Neurobiology of Learning and Memory* **90**, 553–559.
- Hiranita T, Soto PL, Newman AH, Katz JL (2009). Assessment of reinforcing effects of benztropine analogs and their effects on cocaine self-administration in rats: comparisons with monoamine uptake inhibitors. *Journal and Pharmacology and Experimental Therapeutics* **329**, 677–686.
- Hope BT, Nye HE, Kelz MB, Self DW, et al. (1994). Induction of a long-lasting AP-1 complex composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments. *Neuron* **13**, 1235–1244.
- Indarte M, Madura JD, Surratt CK (2008). Dopamine transporter comparative molecular modeling and binding site prediction using the LeuT(Aa) leucine transporter as a template. *Proteins* **70**, 1033–1046.
- Katz JL, Agoston GE, Alling KL, Kline RH, et al. (2001). Dopamine transporter binding without cocaine-like behavioral effects: synthesis and evaluation of benztropine analogs alone and in combination with cocaine in rodents. *Psychopharmacology (Berlin)* **154**, 362–374.
- Katz JL, Izenwasser S, Kline RH, Allen AC, et al. (1999). Novel 3alpha-diphenylmethoxytropane analogs: selective dopamine uptake inhibitors with behavioral effects distinct from those of cocaine. *Journal and Pharmacology and Experimental Therapeutics* **288**, 302–315.
- Kelley AE (1999). Functional specificity of ventral striatal compartments in appetitive behaviors. *Annals of the New York Academy of Sciences* **877**, 71–90.
- Kelz MB, Chen J, Carlezon Jr. WA, Whisler, et al. (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature* **401**, 272–276.
- Kim Y, Teylan MA, Baron M, Sands A, et al. (2009). Methylphenidate-induced dendritic spine formation and DeltaFosB expression in nucleus accumbens. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**, 2915–2920.
- Koob GF, Le HT, Creese I (1987). The D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. *Neuroscience Letters* **79**, 315–320.
- Li SM, Newman AH, Katz JL (2005). Place conditioning and locomotor effects of N-substituted,

- 4',4''-difluorobenzotropine analogs in rats. *Journal and Pharmacology and Experimental Therapeutics* **313**, 1223–1230.
- Loland CJ, Desai RI, Zou MF, Cao J, et al.** (2008). Relationship between conformational changes in the dopamine transporter and cocaine-like subjective effects of uptake inhibitors. *Molecular Pharmacology* **73**, 813–823.
- Lott DC, Kim SJ, Cook EH, et al.** (2005). Dopamine transporter gene associated with diminished subjective response to amphetamine. *Neuropsychopharmacology* **30**, 602–609.
- McClung CA, Nestler EJ** (2003). Regulation of gene expression and cocaine reward by CREB and DeltaFosB. *Nature Neuroscience* **6**, 1208–1215.
- Meredith GE, Baldo BA, Andrezejewski ME, Kelley AE** (2008). The structural basis for mapping behavior onto the ventral striatum and its subdivisions. *Brain Structure and Function* **213**, 17–27.
- Newman AH, Kulkarni S** (2002). Probes for the dopamine transporter: new leads toward a cocaine-abuse therapeutic – a focus on analogues of benztropine and rimcazole. *Medicinal Research Reviews* **22**, 429–464.
- Nishino S** (2007). Narcolepsy: pathophysiology and pharmacology. *Journal of Clinical Psychiatry* **68** (Suppl. 13), 9–15.
- Olausson P, Jentsch JD, Tronson N, Neve RL, et al.** (2006). DeltaFosB in the nucleus accumbens regulates food-reinforced instrumental behavior and motivation. *Journal of Neuroscience* **26**, 9196–9204.
- Paxinos G, Franklin KBJ** (2001). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd edn. San Diego: Academic Press.
- Phillips GD, Robbins TW, Everitt BJ** (1994). Bilateral intra-accumbens self-administration of d-amphetamine: antagonism with intra-accumbens SCH-23390 and sulpiride. *Psychopharmacology (Berlin)* **114**, 477–485.
- Pierce RC, Kalivas PW** (1997). A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Research Review* **25**, 192–216.
- Raje S, Cornish J, Newman AH, Cao J, et al.** (2005). Pharmacodynamic assessment of the benztropine analogues AHN-1055 and AHN-2005 using intracerebral microdialysis to evaluate brain dopamine levels and pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling. *Pharmaceutical Research* **22**, 603–612.
- Raje S, Dowling TC, Eddington ND** (2002). Determination of the benztropine analog AHN-1055, a dopamine uptake inhibitor, in rat plasma and brain by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography, B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **768**, 305–313.
- Ritz MC, Lamb RJ, Goldberg SR, Kuhar MJ** (1987). Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* **237**, 1219–1223.
- Robertson SD, Matthies HJ, Galli A** (2009). A closer look at amphetamine-induced reverse transport and trafficking of the dopamine and norepinephrine transporters. *Molecular Neurobiology* **39**, 73–80.
- Rothman RB** (1990). High affinity dopamine reuptake inhibitors as potential cocaine antagonists: a strategy for drug development. *Life Sciences* **46**, L17–L21.
- Rothman RB, Baumann MH** (2006). Balance between dopamine and serotonin release modulates behavioral effects of amphetamine-type drugs. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1074**, 245–260.
- Rothman RB, Baumann MH, Prisinzano TE, Newman AH** (2008). Dopamine transport inhibitors based on GBR12909 and benztropine as potential medications to treat cocaine addiction. *Biochemical Pharmacology* **75**, 2–16.
- Schmitz Y, Lee CJ, Schmauss C, Gonon F, et al.** (2001). Amphetamine distorts stimulation-dependent dopamine overflow: effects on D2 autoreceptors, transporters, and synaptic vesicle stores. *Journal of Neuroscience* **21**, 5916–5924.
- Sofuoglu M, Sewell RA** (2009). Norepinephrine and stimulant addiction. *Addiction Biology* **14**, 119–129.
- Sulzer D, Sonders MS, Poulsen NW, Galli A** (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: a review. *Progress in Neurobiology* **75**, 406–433.
- Tanda G, Newman AH, Ebbs AL, Tronci V, et al.** (2009). Combinations of cocaine with other dopamine uptake inhibitors: assessment of additivity. *Journal and Pharmacology and Experimental Therapeutics* **330**, 802–809.
- Tzschentke TM** (2007). Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction Biology* **12**, 227–462.
- United Nations Office on Drugs and Crime** (2009). World Drug Report. Vienna: United Nations Publication Sales No. E.09.XI.12.
- Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Hernandez-Rabaza V, Nacher A, et al.** (2009). The dopamine uptake inhibitor 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]-tropane reduces cocaine-induced early-gene expression, locomotor activity, and conditioned reward. *Neuropsychopharmacology* **34**, 2497–2507.
- Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Murga J, Carda M, et al.** (2010). The high affinity dopamine uptake inhibitor, JHW 007, blocks cocaine-induced reward, locomotor stimulation and sensitization. *European Neuropsychopharmacology* **20**, 501–508.
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Gatley SJ, et al.** (1996). Relationship between psychostimulant-induced 'high' and dopamine transporter occupancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **93**, 10388–10392.
- Wirtshafter D** (2006). The selective m1 muscarinic antagonist MT-7 blocks pilocarpine-induced striatal Fos expression. *Brain Research* **1085**, 127–131.

The atypical dopamine transport inhibitor, JHW 007, prevents
amphetamine-induced sensitization and synaptic reorganization within the
nucleus accumbens

Clara Velázquez-Sánchez¹, José M. García-Verdugo², Juan Murga³ and Juan J. Canales¹

¹Behavioural Neuroscience, Department of Psychology, University of Canterbury,
Christchurch, New Zealand

²Laboratory of Comparative Neurobiology, Cavanilles Institute (ICBiBE), University of
Valencia, Valencia, Spain

³Department of Inorganic and Organic Chemistry, University Jaime I, Castellón, Spain

*Address for correspondence:

Juan J. Canales, *D.Phil.*
Behavioural Neuroscience, Department of Psychology
University of Canterbury
Private Bag 4800, Christchurch 8140
New Zealand
Tel: 64 3 364 2987 Ext. 7005
Email: juan.canales@canterbury.ac.nz

Abstract

Benztropine (BZT) analogs, a family of agents with high affinity for the dopamine transporter have been postulated as potential treatments in stimulant abuse due to their ability to attenuate a wide range of effects evoked by psychomotor stimulants such as cocaine and amphetamine (AMPH). Repeating administration of drugs, including stimulants, can result in behavioural sensitization, a progressive increase in their psychomotor activating effects. We examined in mice the sensitizing effects and the neuroplasticity changes elicited by chronic AMPH exposure, and the modulation of these effects by the BZT derivative and atypical dopamine uptake inhibitor, JHW007, a candidate medication for stimulant abuse. The results indicated that JHW007 did not produce sensitized locomotor activity when given alone but prevented the sensitized motor behavior induced by chronic AMPH administration. Morphological analysis of medium spiny neurons of the nucleus accumbens revealed that JHW 007 prevented the neuroadaptations induced by chronic AMPH exposure, including increments in dendritic arborization, lengthening of dendritic processes and increases in spine density. Furthermore, data revealed that AMPH produced an increase in the density of asymmetric, possibly glutamatergic synapses in the nucleus accumbens, an effect that was also blocked by JHW007 pretreatment. The present observations demonstrate that JHW007 is able to prevent not only AMPH-induced behavioural sensitization but also the long-term structural changes induced by chronic AMPH in the nucleus accumbens. Such findings support the development and evaluation of BZT derivatives as possible leads for treatment in stimulant addiction.

Key words: amphetamine, benztropine analog, sensitization, nucleus accumbens, dendritic spines, asymmetric synapses

1. Introduction

Behavioural sensitization refers to the progressive increase in the psychomotor effects that many drugs of abuse produce after repeated and intermittent administration (Robinson and Becker 1986; Robinson and Berridge 1993). Drugs such as cocaine, amphetamine (AMPH), methamphetamine, ethanol, nicotine, morphine and Δ^9 -tetrahydrocannabinol are all able to induce behavioural sensitization that results in an augmented locomotor response to subsequent challenge with the drug (Pierce and Kalivas 1997; Vanderschuren and Kalivas 2000). The mesocorticolimbic dopamine system plays an important role in the development of behavioural sensitization (Koob and Bloom 1988; Wise and Bozarth 1987). Research in the last 20 years has identified a range of plasticity changes in the ventral tegmental area (VTA), the nucleus accumbens (NAc) and medial prefrontal cortex (PFC) in the form of both functional and structural adaptations (Kalivas and Stewart 1991; Pierce and Kalivas 1997; Robinson and Becker 1986; Stewart and Badiani 1993; Wolf 1998), which may last for prolonged periods of time after drug withdrawal (Kalivas and Stewart 1991; Paulson *et al.* 1991; Stewart and Badiani 1993). Such structural modifications could be responsible for persistent changes in behaviour, including stimulant-induced psychosis and addiction (Robinson and Becker 1986; Segal *et al.* 1981).

Converging evidence has revealed that the administration of cocaine and AMPH, either by the experimenter or self-administered, increases the spine density of medium spiny neurons (MSNs) in both the shell and core regions of NAc (Li *et al.* 2003; Robinson *et al.* 2001; Robinson and Kolb 1999) and also in pyramidal cells of the medial PFC (Robinson and Kolb 1999). The increase in spine density in the NAc correlates with increases in dendritic branching (Kolb *et al.* 2003; Robinson and Kolb 1997) and at least

for AMPH with increases in the length of dendrites of NAc neurons and layer III neurons of medial PFC (Robinson and Kolb 1997). Several other forms of experience-dependent plasticity, including learning and memory, exposure to enriched environments and recovery of function after injury, are also known to associate with persistent changes in behaviour and modifications of synaptic connectivity patterns (Greenough 1984; Greenough and Bailey 1988; Kolb *et al.* 1998). Previous studies have shown that as dendritic surface increases, there is also an augmentation in the number of synaptic contacts, the majority of which are excitatory synapses (Harris and Kater 1994). In rats raised in enriched environments or subjected to learning tasks, increments in the dendritic surface of cortical neurons correlated with increases in the number of contacts per cell (Greenough *et al.* 1990; Greenough and Bailey 1988). Changes in the relative weight of excitatory neurotransmission can also play a role in drug-induced sensitization. Repeated AMPH administration produced a significant increase in the number of asymmetric axospinous synapses in the mPFC (Morshedi *et al.* 2009). Further, a sensitizing AMPH regimen increased spine density in distal dendrites of striatal neurons, suggesting preferential reorganization of synapses at the site of DA-glutamate interaction (Li *et al.* 2003). Preventing the occurrence or altering the course of such morphological alterations could block the emergence of at least some maladaptive behavioural consequences of chronic stimulant exposure.

N-substituted benztropine (BZT) analogues are atypical dopamine uptake blockers with distinct pharmacological and functional properties that differ from classical psychostimulants such as cocaine and AMPH. In spite of their high affinity for the dopamine transporter (DAT), BZT derivatives generally exhibit limited ability to induce locomotor activity and place preference (Katz *et al.* 2004; Velazquez-Sanchez *et al.*

2009; Velazquez-Sanchez *et al.* 2010a), as well as weak reinforcing efficacy (Ferragud *et al.* 2009; Hiranita *et al.* 2009). The behavioural profile of BZT analogues could be the result of their distinct pharmacokinetic characteristics, including slow onset and prolonged mode of action (Raje *et al.* 2003). AHN 1055 and JHW 007, two analogs of the BZT family, are able to block the sensitized locomotor response evoked by repeated cocaine and AMPH exposure (Velazquez-Sanchez *et al.* 2010a; Velazquez-Sanchez *et al.* 2010b). The current studies aimed at investigating the mechanisms underlying the ability of JHW 007 to attenuate amphetamine-induced behavioural sensitization in mice, including examination of patterns of synaptic remodelling in the nucleus accumbens.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects. Male Swiss OF1 mice obtained from Charles River (Barcelona, Spain) served as experimental subjects. Mice were 5-6 weeks-old and weighted 22-26 g at the beginning of the experiments. Animals were allowed a period of four days to acclimatize to the research facility holding rooms before the experiments commenced. Food and water were available *ad libitum*. The housing room was maintained under standard conditions of temperature (21 ± 2 °C) and humidity (45–55%) and was kept on a 12 h light/dark cycle (lights on at 9:00 AM). All experiments were carried out in accordance with current European directives (86/609/ECC) for animal experimentation and were approved by the Ethics Committee of the Faculty of Pharmacy, University of Valencia.

2.2. Pharmacological treatments. The BZT analogue, JHW 007 [(N-(n-butyl)-3 α -[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]-tropane)], was synthesized as described previously (Agoston *et al.* 1997). The purity of the compound was analyzed by magnetic resonance, exceeding 98%. JHW 007 was dissolved in 0.9% saline and sonicated until

complete solubilization. The dose of JHW 007 was selected based on previous data showing complete blockade of cocaine's effects (e.g., place preference, locomotor activity) in mice at 10 mg/kg i.p. (Velazquez-Sanchez *et al.* 2010a). d-AMPH sulphate (Sigma-Aldrich, UK) was dissolved in 0.9% saline and injected at a dose of 2.5 mg/kg i.p. during the three weeks of treatment and at a dose of 1 mg/kg i.p. before the sensitization test. Dose selection for the AMPH treatment was based on pilot studies carried out in our laboratories.

2.3. Sensitization assay. Mice were randomly distributed into four experimental groups receiving 0.9% saline, (n= 11), JHW 007 (10 mg/kg i.p.) (n= 11), AMPH (2.5 mg/kg i.p.) (n= 9) or the combination of both JHW 007 and AMPH (n= 10). Each animal received two injections: saline or JHW 007 as pre-treatment, followed by saline or AMPH as treatment. Due to its long mode of action (Raje *et al.* 2003), the pre-treatment with saline or JHW 007 was administered 1 h before stimulant challenge, as in previous studies (Velazquez-Sanchez *et al.* 2010a). The treatments were administered once a day for five consecutive days followed by two drug-free days, and this procedure was repeated during three consecutive weeks (Fig. 1). Repeated and intermittent injection schedule was selected to induce robust behavioural sensitization and changes in NAc synaptic specializations, as shown in previous studies (Morshedi and Meredith 2007; Paulson et al. 1991; Robinson and Camp 1987; Robinson and Kolb 1997; Robinson and Kolb 1999). On the first (day 1) and last (day 15) sessions of drug administration, locomotor activity was measured in Perspex boxes (53 x 28 x 15) during 30 min immediately after the administration of AMPH. The mice were monitored with a video-tracking system with image analysis software (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D'Or, France) and the distance travelled was automatically recorded. On the rest of the

days, the mice received the treatments and were returned to their home cages. After three weeks of withdrawal (days 20-42), mice received an AMPH (1 mg/kg) or saline challenge (days 43-44) on two consecutive days in counterbalanced fashion and locomotor behaviour was measured. After the behavioural assay, brains were processed with the Golgi silver-impregnation method to study the dendritic structure of projection neurons of the NAc. Separate groups of mice received the same treatments and doses with 0.9% saline, (n= 4), JHW 007 (n= 5), AMPH (n= 4) or the combination of both JHW 007 and AMPH (n= 4) and their brains were processed for electron microscopy (EM) to examine effects at the ultrastructural level.

2.4. Golgi-impregnation method and quantification. Mice were transcardially perfused under pentobarbital anaesthesia (100 mg/kg i.p.) 24 h after the last challenge with 0.9% saline followed by 2% paraformaldehyde and 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Brains were removed and post-fixed overnight in the same solution before processing for Golgi method. Tissue blocks (2.5-3 mm) were fixed with 3% potassium dichromate and 5% glutaraldehyde during 5-7 days of induration at 4°C in darkness followed by impregnation with 0.75% silver nitrate solution for 3-5 days in the same conditions. After impregnation, the brains were cut into 150 µm-thick transverse sections with a vibratome (Leica VT-1000), immersed in 70% ethanol, dehydrated with escalated ethanol solutions and embedded in araldite between two coverslips (Guirado *et al.* 2009). MSNs of the NAc were recognized by their soma size, dendritic projections and spines. For MSNs to be considered for examination, the extent of the total tree had to be well stained, visible and not masked by astrocytes, blood vessels or stain precipitation. Selected cells that displayed a complete Golgi impregnation were photographed and drawn at 40X using a microscope (Zeiss Axiostar Plus, Gottingen,

Germany) equipped with a computer screen and a 18 megapixel video camera Canon EOS 7D (Canon Inc., Tokyo, Japan), which provided HD live images. Reconstructions of the dendritic tree were generated for each neuron and the tracings were quantified by Sholl analysis (Sholl 1953). A transparent grid with concentric and equidistant circles (12.5µm) was centred on the soma and the number of intersections in each ring was counted and used as estimation of the dendritic arborization (Alcantara-Gonzalez et al. 2010; Martinez-Tellez et al. 2009; Sholl 1953). To obtain a length measure of the dendritic tree, drawings of the medium spiny neurons of the NAc were scaled and the length of each dendrite of each cell was measured with image analysis software (Image J, NIH). Spine density was quantified with a 100X oil immersion objective. Second order dendritic segments from the soma were traced (at least >10 µm) and the spines along that length were counted. Results were expressed as the number of spines per 10 µm of dendrite (Martin *et al.* 2011). The tracings were coded so the investigator was blind to the treatments groups.

2.5. Transmission electron microscopy and quantification. After the conclusion of the experimental protocol, the animals for the EM study were anesthetized with pentobarbital (100 mg/kg i.p.) and perfused through the heart with 0.9% saline followed by 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in 0.1 M PB. After removed and post-fixed during 24 h, brains were washed in 0.1 M PB and cut into 200 µm-thick transverse sections with a vibratome (Leica VT-1000). Tissue samples were post-fixed in 2% osmium tetroxide in 0.1 M PB for two hours and partially dehydrated through increasing ethanol solutions. Sections were then stained with 2% uranyl acetate in 70% ethanol for 2.5 h. Followed dehydration, ethanol was replaced with propylene oxide and brain sections were flat-embedded in Durcupan araldite (Fluka BioChemika,

Ronkokoma, NY, USA). After polymerization, semithin sections (1.5 μm) were obtained, stained with 1% toluidine blue and the regions of interest for EM analysis were selected. Ultrathin sections of the NAc sections were cut on an ultramicrotome (Leica EM UC6) and placed on single-slot copper grids. Sections were stained with Reynolds lead citrate and photographed with a Jeol CX-1010 electron microscope (FEI Tecnai, Hillsboro, OR, USA) (Alfaro-Cervelló C *et al.* 2011). We captured 90-120 photographs per treatment (410 in total) and the number of asymmetric synapses was counted within each frame. The size of each counting frame was 12 μm^2 .

2.6. Statistical analysis. Parametrical data were analyzed by ANOVA using Stat View 5.0 software. Main effects in the ANOVA were followed analyzed by the Newman-Keuls (N-K) post hoc procedure using the overall sampling error from the ANOVA as denominator. Statistical significance was set at $\alpha=0.05$ per experiment.

3. Results

3.1. JHW 007 blocks amphetamine-induced locomotor activity and prevents long-term sensitization. To study how pre-treatment with JHW 007 would affect the long-term expression of AMPH-induced locomotor sensitization, mice were exposed to chronic AMPH injections during 3 weeks (Fig. 1) and locomotor activity was measured on the first and last day of treatments. ANOVA was performed for each of these test sessions with one between-subjects variable, Treatment, with four levels (four groups of treatment) and one within-subjects variable, Time, with six levels (6 bins of 5 min each). ANOVA indicated a significant effect of the Treatment factor both on the first day of AMPH exposure ($F_{3,200}=34.758$, $p<0.0001$) and on the last day ($F_{3,200}=3.865$, $p=0.0161$). AMPH potently increased locomotor activity levels compared with the saline treatment (Fig. 2A, 2B). The stimulant effects of AMPH were completely

blocked by JHW 007, which did not produce any effects on locomotor activity when given alone. There were no differences in the mean distance covered on the day 1 and day 15, as shown in by the lack of interaction in an overall ANOVA which incorporated the results of both tests ($F_{3,40} = 0.684$, $p < 0.5671$), with the main effect of AMPH remaining significant ($F_{3,40} = 14.935$, $p < 0.0001$) (Fig. 2B).

Following three weeks of withdrawal, animals received a challenge with either AMPH (1 mg/kg i.p.) or saline on two consecutive days in counterbalanced order. ANOVA for locomotor activity counts was performed with one between-subjects variable, Treatment, with four levels (four groups of treatment) and two within-subjects variables, Challenge, with two levels (saline or AMPH), and Time, with six levels (6 bins of 5 min each). The analysis showed a significant interaction Treatment x Challenge x Time ($F_{15,185} = 2.369$, $p = 0.0039$). Exploration of this interaction with *post-hoc* tests indicated that, as expected, the challenge with saline did not produce differences in locomotor activity between groups. On the contrary, striking differences emerged when all groups were challenged with AMPH. AMPH treatment revealed locomotor sensitization that was evident in the first 10 min post-injection as a strong boost of locomotor behaviour in the group previously exposed to AMPH treatment alone, compared with the values corresponding to control animals ($p < 0.05$ by N-K test) (Fig. 3). Importantly, the sensitization effect was absent in the mice that had received the combination of JHW 007 and AMPH during the sensitization phase ($p < 0.05$ by N-K test). Moreover, mice that were treated with the BZT analogue alone during the three weeks did not show sensitization effects and were in fact largely insensitive to AMPH challenge (this was evident comparing the AMPH response of this treatment group with

the response to AMPH of the control group treated chronically with saline alone, Figs. 3A, 3B, between-groups comparison, $p < 0.05$ by N-K tests).

3.2. JHW 007 blocks the amphetamine-induced structural modifications and increased synapses in the nucleus accumbens MSNs. To study the long-lasting neural changes induced by repeated AMPH exposure in the sensitized animals, brains were processed with the Golgi method. Patterns of dendritic arborization, length of the dendrites and number of spines were analysed in MSNs of the NAc. The number of ring intersections measured with the Sholl analysis was used to estimate the dendritic arborization. ANOVA was performed using one between-subjects variable, Treatment, with four levels (four groups of treatment) and one within-subjects, Rings, with 15 levels (number of rings counted). The ANOVA revealed a significant effect of the treatment in the number of intersections per ring ($F_{42,392} = 1.458$, $p = 0.0370$). *Post-hoc* analysis showed that the AMPH treated animals presented a higher number of intersections in the second ring from the soma compared with the number of intersections counted in the experimental groups ($p < 0.05$ by N-K test) (Fig. 4). The analysis of the length of dendritic processes showed an increase AMPH-sensitized group compared with the control group ($F_{3,27} = 3.43$, $p = 0.0310$). Administration of the BZT analogue prior to AMPH during the sensitization phase prevented the increase observed in AMPH treated animals ($p < 0.05$ by N-K test) (Fig. 5A). Chronic treatment with JHW 007 alone did not induce significant changes in the pattern of arborizations. Analysis of spine density also revealed significant differences that were consistent with the working hypotheses. ANOVA showed a robust increase in spine density in the AMPH group. Again, such long-term effect of chronic AMPH exposure was absent in the groups that received JHW 007, both alone or in combination with AMPH ($F_{3,121} = 3.312$, $p = 0.0224$; $p < 0.05$

by N-K test) (Fig. 5B). The values obtained of density in the control group are within the range of previously published data (Lawrence *et al.* 2011). Subsequently, to gain further insight into the alterations induced by AMPH in the NAc at the structural and functional level, the number of asymmetric synapses was measured in another set of animals treated under the same experimental conditions. The ANOVA yielded a significant effect of the experimental treatments ($F_{3,13} = 4.175$, $p = 0.0282$). *Post hoc* N-K tests revealed an augmentation in the density of the asymmetric synapses in the group chronically exposed to AMPH treatment compared with the control group. By contrast, chronic treatment with JHW 007 alone did not increase dendritic spine density and prevented the increase induced by repeated AMPH administration when given as a pre-treatment (Fig. 6).

4. Discussion

The general aim of the present manuscript was to determine the efficacy of the high affinity DAT inhibitor, JHW 007, in preventing AMPH-induced sensitization and some of the key neuronal adaptations that underlie the sensitization process. We found that repeated exposure to AMPH produced behavioural sensitization and changed the morphology and microenvironment of NAc MSNs. Chronic AMPH treatment increased the size of MSNs' dendritic tree and the density of spines in MSNs' dendrites, and altered the weight of excitatory input to MSNs by augmenting the number of asymmetric synapses in the NAc region. By contrast, JHW 007 did not produce sensitized behaviour by itself and, remarkably, prevented the AMPH-induced neuroadaptations when given as a pretreatment. The observations reported here constitute the first evidence that a DAT inhibitor with low abuse profile blocks not only

the behavioural effects of AMPH but also prevents the structural and functional changes induced by prolonged AMPH treatment and withdrawal.

Considerable efforts have been made in the last two decades to develop medications with therapeutic potential in the treatment of psychostimulant addiction. Most of the new agents have been designed to interact with the DAT with the aim to either antagonize the actions of stimulants at the transporter site or act as a “substitute” by inducing sustained effects on DA neurotransmission (Gorelick *et al.* 2004; Rothman 1990). The profile desired for an agent of this kind would feature characteristics such as high affinity for the DAT, slow permeation through the blood brain barrier, delayed receptor offset, lengthened duration of the psychopharmacological effects and weak reinforcing properties (Newman & Kulkarni, 2002; Rothman et al. 2008). Several DAT inhibitors have been developed presenting some of these features, including GBR 12909, benztropine, mazindol, methylphenidate and rimcazone. Such compounds have been widely investigated in animal models and even in clinical trials, but results obtained so far are complicated by the fact that several of these agents may have significant abuse potential (Katz et al. 2003; Rothman 1990; Rothman et al. 2008). Nevertheless, the hypothesis that substances that bind to the DAT in a manner different to psychostimulants may have potential as substitutes remains a theoretically plausible approach in addiction pharmacotherapeutics. BZT analogs, a series of compounds that derive from BZT (Newman *et al.* 1994), have high affinity for the DAT and show pharmacokinetic, neurochemical and behavioural properties that are fitting with those of a replacement treatment for stimulant abuse (Newman and Kulkarni 2002; Rothman *et al.* 2008). Some of these BZT analogs, including AHN-1055 and JHW 007, have been evaluated in preclinical models of drug-induced reward, locomotor stimulation,

sensitization, self-administration and gene expression, exhibiting characteristics that are unlike the classical psychostimulants, together with distinct therapeutic-like properties (Desai et al. 2005; Ferragud et al. 2009; Hiranita et al. 2009; Velazquez-Sanchez et al. 2009; Velazquez-Sanchez et al. 2010a; Velazquez-Sanchez et al. 2010b; Velazquez-Sanchez et al. 2012).

The structural neural modifications induced by stimulant exposure have been known for two decades. Some of these drug-induced adaptations have been linked to behavioural sensitization, drug seeking behaviour and addiction (Robinson and Berridge 1993; Robinson and Berridge 2003). It has been hypothesized that the ability of some drugs to induce changes in synaptic connectivity (e.g., an increase in the spine density in neurons within reward-related brain regions) may mediate in part the long-term sensitivity and compulsive pattern of drug-taking behaviour observed in human addicts (Robinson and Kolb 2004). Repeated administration of cocaine or AMPH produces persistent alterations in locomotor behaviour (i.e., sensitization) that may derive from the reorganization of synapses within specific circuits. Golgi impregnation studies revealed that stimulant drugs, either passively given or self-administered, can increase spine density in MSNs of the NAc as well as produce an increment in dendritic branching (Crombag et al. 2005; Robinson and Kolb 2004). However, the causal role for such structural changes in sensitization remains controversial (Kim *et al.* 2009).

The experiments described here provide evidence that JHW 007 antagonized the stimulant effects induced by AMPH, while lacking stimulant effects when administered alone. Remarkably, the analog was also able to block the sensitized response observed following drug challenge in mice treated chronically with AMPH, without producing sensitizing effects in its own right. These results are consistent with, and further

reinforce, previous observations indicating that BZT analogs, including JHW 007 and AHN-1055, attenuate the long-term psychomotor activating effects of repeated stimulant exposure (Velazquez-Sanchez et al. 2010a; Velazquez-Sanchez et al. 2010b). A recent study showed that JHW 007 exhibits two phases of association to the DAT: a rapid phase, with a half-life of seconds, followed by a slow phase, with a half-life of tens of seconds, and evidence suggests that this rapid association with the DAT may be responsible for its cocaine-unlike effects and ability to block cocaine's effects soon after treatment (Kopajtic *et al.* 2010). In microdialysis experiments, JHW 007 increased DA striatal levels with lesser efficacy than cocaine. In addition, the combination of cocaine and its analog WIN 35,428 had an addictive effect whereas the combination of cocaine and JHW 007 produced a sub-additive effect, suggesting different modes of action (Tanda *et al.* 2009). In addition, we previously showed that repeated treatment with another BZT analog, AHN 1055, failed to produce an accumulation of Δ FosB protein in the NAc and strongly reduced the expression of the protein after AMPH treatment (Velazquez-Sanchez *et al.* 2010b). By contrast, methylphenidate, another DA uptake blocker, induced locomotor sensitization (Podet *et al.* 2010) and increased both the number of Δ FosB positive cells in the striatum and the number of spines in MSNs of the NAc core (Kim *et al.* 2009). In view of the similarities in chemical structure between these BZT analogs, it is likely that their modes of action and subsequent neurochemical adaptations might also be analogous. Thus, inhibition of intracellular signaling pathways, including Δ FosB persistent accumulation, may be one of the mechanisms through which BZT analogs, such as AHN 1055 and JHW 007, prevent some of the long-term neuroadaptations induced by chronic stimulant exposure, such as changes in dendritic patterning and spine density in MSNs of the NAc.

Not only did JHW 007 block AMPH-induced locomotor sensitization when administered as a pretreatment, but it also produced a long-term reduction in the sensitivity to AMPH when administered alone during the conditioning phase. The underlying mechanisms for this effect require further investigation. Previous evidence has revealed that substitution treatment with AHN 1055 reduced sensitivity to cocaine-stimulated changes in c-Fos, brain derived neurotrophic factor (BDNF) and Fas-associated death domain (FADD) proteins in the PFC, and reduced the behavioral effects (i.e., relapse to drug seeking) of cocaine challenge after chronic cocaine exposure (Velazquez-Sanchez *et al.* 2012). Together, these data suggest that chronic treatment with BZT derivatives may diminish sensitivity to psychomotor stimulants, which could be beneficial in clinical settings in order to reduce the risk of relapse.

A strong relationship between the dendritic structure and the number of synapses has been established previously. Complex environments and some types of learning experiences can increase the dendritic surface of cortical neurons, which in turn correlates with an increment in the number of synapses (Greenough 1984; Greenough and Bailey 1988). Similarly, another study showed an association between the number of branches and synapses in the sympathetic and parasympathetic ganglia (Purves 1994). Further, Morshedi and colleagues (Morshedi *et al.* 2009) showed a significant increase in the number of asymmetric axospinous, but not axodendritic synapses, within the medial PFC following repeated AMPH exposure. Coincidentally, Robinson and Kolb had previously reported an augmentation in the density of spines in the apical, but not basilar, dendrites of pyramidal neurons in the PFC (Robinson and Kolb 1997; Robinson and Kolb 1999). This evidence suggests that the increase in spine density and the proliferation of synapses may be coupled phenomena that occur simultaneously in

response to persistent stimulant-induced neurochemical changes. Our results indicate that indeed both phenomena occur concurrently following chronic AMPH treatment and are first to identify an agent with potential therapeutic properties that fully prevents such structural and functional neuroadaptations. We used one dose of JHW 007 given that sensitization is a consequence of repeated drug exposure, rather than a graded, dose-dependent phenomenon. Dose was carefully selected based on previous evidence indicating complete blockade of cocaine's effects in mice (Velazquez-Sanchez *et al.* 2010a). In agreement with those findings, the ability of JHW 007 to fully block AMPH-induced behavioural and neural adaptations was unambiguously demonstrated in the current study. Notwithstanding the relevance of identifying substances that prevent some neuroadaptations induced by psychomotor stimulants, further experiments should investigate the ability of this and similar compound to revert the deleterious effects of the drugs, including behavioural sensitization, once they have been established. Previous studies indicate that this may be possible under certain conditions (Moro *et al.* 2007; Shuto *et al.* 2006; Shuto *et al.* 2008). Similarly, substitution studies may provide clearer evidence regarding their possible therapeutic efficacy.

In summary, the results presented showed that a high affinity dopamine uptake blocker with reduced abuse potential completely prevented the long-term behavioural, structural and functional adaptations elicited by chronic AMPH treatment. While several forms of non-specific pharmacology are currently in use to treat addiction, there is still an unmet need to develop medications that may facilitate blockade of symptoms and detoxification, and promote quicker recovery from chronic stimulant abuse. The findings presented suggest that medications that target the DAT with a mode of action

similar to JHW 007 may fit this profile and assist in the treatment of stimulant addiction.

ACCEPTED MANUSCRIPT

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contribution

All authors have participated in the research described. Authors Clara Velázquez-Sánchez and Juan J. Canales designed the study and wrote the manuscript. Authors Clara Velázquez-Sánchez and Juan Murga performed experiments and analyzed the data. Jose M. García-Verdugo performed the electron microscopy study. All authors contributed to the content and approved the final version for publication.

Acknowledgements

This work was supported by grants to J.J.C. from the Department of Psychology of the University of Canterbury (New Zealand), Instituto de Salud Carlos III (grant PI10/00297, Spanish Ministry of Science and Innovation), and Red de Trastornos Adictivos (RETICS). The authors thank Agueda Ferrer, Mayte Casado and Mario Soriano-Navarro for technical assistance.

Reference List

1. Agoston G.E., Wu J.H., Izenwasser S., George C., Katz J., Kline R.H., Newman A.H. (1997) Novel N-substituted 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]tropane analogues: selective ligands for the dopamine transporter. *J Med Chem* 40:4329-4339
2. Alcantara-Gonzalez F., Juarez I., Solis O., Martinez-Tellez I., Camacho-Abrego I., Masliah E., Mena R., Flores G. (2010) Enhanced dendritic spine number of neurons of the prefrontal cortex, hippocampus, and nucleus accumbens in old rats after chronic donepezil administration. *Synapse* 64:786-793
3. Alfaro-Cervelló C., Soriano-Navarro M., Gomez-Pinedo U., Garcia-Verdugo J.M. (2011) Correlation of light and electron microscopy for immunogold staining. GFP immunogold, tool in biological research. *Microscopy Science, Technology, Applications and education* 844-850
4. Crombag H.S., Gorny G., Li Y., Kolb B., Robinson T.E. (2005) Opposite effects of amphetamine self-administration experience on dendritic spines in the medial and orbital prefrontal cortex. *Cereb Cortex* 15:341-348
5. Desai R.I., Kopajtic T.A., Koffarnus M., Newman A.H., Katz J.L. (2005) Identification of a dopamine transporter ligand that blocks the stimulant effects of cocaine. *J Neurosci* 25:1889-1893
6. Ferragud A., Velazquez-Sanchez C., Hernandez-Rabaza V., Nacher A., Merino V., Carda M., Murga J., Canales J.J. (2009) A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* 207:281-289
7. Gorelick D.A., Gardner E.L., Xi Z.X. (2004) Agents in development for the management of cocaine abuse. *Drugs* 64:1547-1573
8. Greenough W.T. (1984) Structural correlates of information storage in the mammalian brain: a review and hypothesis. *Trends neurosci* 7:229-233
9. Greenough W.T., Bailey C.H. (1988) The anatomy of a memory: convergence of results across a diversity of tests. *Trends neurosci* 11:142-147
10. Greenough WT, Withers GS, Wallace CS (1990) Morphological changes in the nervous system arising from behavioural experience: what is the evidence that they are involved in learning and memory? In: Squire LR, Lindenlaub E (eds) Schattauder, New York, pp 159-185
11. Guirado R., Varea E., Castillo-Gomez E., Gomez-Climent M.A., Rovira-Esteban L., Blasco-Ibanez J.M., Crespo C., Martinez-Guijarro F.J., Nacher J. (2009)

Effects of chronic fluoxetine treatment on the rat somatosensory cortex: activation and induction of neuronal structural plasticity. *Neurosci Lett* 457:12-15

12. Harris K.M., Kater S.B. (1994) Dendritic spines: cellular specializations imparting both stability and flexibility to synaptic function. *Annu Rev Neurosci* 17:341-371
13. Hiranita T., Soto P.L., Newman A.H., Katz J.L. (2009) Assessment of reinforcing effects of bantzropine analogs and their effects on cocaine self-administration in rats: comparisons with monoamine uptake inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 329:677-686
14. Kalivas P.W., Stewart J. (1991) Dopamine transmission in the initiation and expression of drug- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res Rev* 16:223-244
15. Katz J.L., Kopajtic T.A., Agoston G.E., Newman A.H. (2004) Effects of N-substituted analogs of bantzropine: diminished cocaine-like effects in dopamine transporter ligands. *J Pharmacol Exp Ther* 309:650-660
16. Katz J.L., Libby T.A., Kopajtic T., Husbands S.M., Newman A.H. (2003) Behavioral effects of rimcazole analogues alone and in combination with cocaine. *Eur J Pharmacol* 468:109-119
17. Kim Y., Teylan M.A., Baron M., Sands A., Nairn A.C., Greengard P. (2009) Methylphenidate-induced dendritic spine formation and DeltaFosB expression in nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:2915-2920
18. Kolb B., Forgie M., Gibb R., Gorny G., Rowntree S. (1998) Age, experience and the changing brain. *Neurosci Biobehav Rev* 22:143-159
19. Kolb B., Gorny G., Li Y., Samaha A.N., Robinson T.E. (2003) Amphetamine or cocaine limits the ability of later experience to promote structural plasticity in the neocortex and nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:10523-10528
20. Koob G.F., Bloom F.E. (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715-723
21. Kopajtic T.A., Liu Y., Surratt C.K., Donovan D.M., Newman A., Katz J.L. (2010) Dopamine transporter-dependent and -independent striatal binding of the bantzropine analog JHW 007, a cocaine antagonist with low abuse liability. *J Pharmacol Exp Ther*
22. Lawrence R.C., Otero N.K., Kelly S.J. (2011) Selective effects of perinatal ethanol exposure in medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Neurotoxicol Teratol*

23. Li Y., Kolb B., Robinson T.E. (2003) The location of persistent amphetamine-induced changes in the density of dendritic spines on medium spiny neurons in the nucleus accumbens and caudate-putamen. *Neuropsychopharmacology* 28:1082-1085
24. Martin B.J., Naughton B.J., Thirtamara-Rajamani K., Yoon D.J., Han D.D., Devries A.C., Gu H.H. (2011) Dopamine transporter inhibition is necessary for cocaine-induced increases in dendritic spine density in the nucleus accumbens. *Synapse* 65:490-496
25. Martinez-Tellez R.I., Hernandez-Torres E., Gamboa C., Flores G. (2009) Prenatal stress alters spine density and dendritic length of nucleus accumbens and hippocampus neurons in rat offspring. *Synapse* 63:794-804
26. Morshedi M.M., Meredith G.E. (2007) Differential laminar effects of amphetamine on prefrontal parvalbumin interneurons. *Neuroscience* 149:617-624
27. Morshedi M.M., Rademacher D.J., Meredith G.E. (2009) Increased synapses in the medial prefrontal cortex are associated with repeated amphetamine administration. *Synapse* 63:126-135
28. Newman A.H., Allen A.C., Izenwasser S., Katz J.L. (1994) Novel 3 alpha-(diphenylmethoxy)tropane analogs: potent dopamine uptake inhibitors without cocaine-like behavioral profiles. *J Med Chem* 37:2258-2261
29. Newman A.H., Kulkarni S. (2002) Probes for the dopamine transporter: new leads toward a cocaine-abuse therapeutic--A focus on analogues of benztropine and rimcazole. *Med Res Rev* 22:429-464
30. Paulson P.E., Camp D.M., Robinson T.E. (1991) Time course of transient behavioral depression and persistent behavioral sensitization in relation to regional brain monoamine concentrations during amphetamine withdrawal in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 103:480-492
31. Pierce R.C., Kalivas P.W. (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25:192-216
32. Podet A., Lee M.J., Swann A.C., Dafny N. (2010) Nucleus accumbens lesions modulate the effects of methylphenidate. *Brain Res Bull* 82:293-301
33. Purves D. (1994) *Neural activity and the growth of the brain*. U.K.:Cambridge UP., Cambridge,
34. Raje S., Cao J., Newman A.H., Gao H., Eddington N.D. (2003) Evaluation of the blood-brain barrier transport, population pharmacokinetics, and brain distribution of benztropine analogs and cocaine using in vitro and in vivo techniques. *J Pharmacol Exp Ther* 307:801-808

35. Robinson T.E., Becker J.B. (1986) Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res* 396:157-198
36. Robinson T.E., Berridge K.C. (1993) The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res Brain Res Rev* 18:247-291
37. Robinson T.E., Berridge K.C. (2003) Addiction. *Annu Rev Psychol* 54:25-53
38. Robinson T.E., Camp D.M. (1987) Long-lasting effects of escalating doses of d-amphetamine on brain monoamines, amphetamine-induced stereotyped behavior and spontaneous nocturnal locomotion. *Pharmacol Biochem Behav* 26:821-827
39. Robinson T.E., Gorny G., Mitton E., Kolb B. (2001) Cocaine self-administration alters the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and neocortex. *Synapse* 39:257-266
40. Robinson T.E., Kolb B. (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J Neurosci* 17:8491-8497
41. Robinson T.E., Kolb B. (1999) Alterations in the morphology of dendrites and dendritic spines in the nucleus accumbens and prefrontal cortex following repeated treatment with amphetamine or cocaine. *Eur J Neurosci* 11:1598-1604
42. Robinson T.E., Kolb B. (2004) Structural plasticity associated with exposure to drugs of abuse. *Neuropharmacology* 47 Suppl 1:33-46
43. Rothman RB (1990) High affinity dopamine reuptake inhibitors as potential cocaine antagonists: a strategy for drug development. *Life Sci* 46:L17-L21
44. Rothman R.B., Baumann M.H., Prisinzano T.E., Newman A.H. (2008) Dopamine transport inhibitors based on GBR12909 and bupropion as potential medications to treat cocaine addiction. *Biochem Pharmacol* 75:2-16
45. Segal D.S., Geyer M.A., Schuckit M.A. (1981) Stimulant-induced psychosis: an evaluation of animal methods. *Essays Neurochem Neuropharmacol* 5:95-129
46. Sholl D.A. (1953) Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat* 87:387-406
47. Stewart J., Badiani A. (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4:289-312
48. Tanda G., Newman A.H., Ebbs A.L., Tronci V., Green J.L., Tallarida R.J., Katz J.L. (2009) Combinations of cocaine with other dopamine uptake inhibitors: assessment of additivity. *J Pharmacol Exp Ther* 330:802-809
49. Vanderschuren L.J., Kalivas P.W. (2000) Alterations in dopaminergic and glutamatergic transmission in the induction and expression of behavioral

sensitization: a critical review of preclinical studies. *Psychopharmacology (Berl)* 151:99-120

50. Velazquez-Sanchez C., Ferragud A., Hernandez-Rabaza V., Nacher A., Merino V., Carda M., Murga J., Canales J.J. (2009) The dopamine uptake inhibitor 3 alpha-[bis(4'-fluorophenyl)methoxy]-tropane reduces cocaine-induced early-gene expression, locomotor activity, and conditioned reward. *Neuropsychopharmacology* 34:2497-2507
51. Velazquez-Sanchez C., Ferragud A., Murga J., Carda M., Canales J.J. (2010a) The high affinity dopamine uptake inhibitor, JHW 007, blocks cocaine-induced reward, locomotor stimulation and sensitization. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:501-508
52. Velazquez-Sanchez C., Ferragud A., Ramos-Miguel A., Garcia-Sevilla J.A., Canales J.J. (2012) Substituting a long-acting dopamine uptake inhibitor for cocaine prevents relapse to cocaine seeking. *Addict Biol*
53. Velazquez-Sanchez C., Ferragud A., Renau-Piqueras J., Canales J.J. (2010b) Therapeutic-like properties of a dopamine uptake inhibitor in animal models of amphetamine addiction. *Int J Neuropsychopharmacol* 11-11
54. Wise R.A., Bozarth M.A. (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469-492
55. Wolf M.E. (1998) The role of excitatory amino acids in behavioral sensitization to psychomotor stimulants. *Prog Neurobiol* 54:679-720

Figure legends

Fig. 1. Diagram of the drug treatment protocol. Animals received three weeks of saline or JHW 007 injections in combination with saline or AMPH. Locomotor activity was measured during the first and last days of treatment. After three weeks of withdrawal, the animals received a challenge with saline or AMPH and the locomotor activity was monitored. After the challenge the animals were perfused and the brains processed for histology.

Fig. 2. Effects induced by AMPH, JHW 007 and combined treatments on locomotor activity. ANOVA showed an effect of the treatment after acute administration but not after 15 days of exposure. AMPH produced robust increases compared with saline. The stimulant effect of AMPH was completely inhibited by JHW 007. The time course of the drug effects is shown in (A). The analysis of the overall distance travelled did not show differences between session 1 and session 15, as shown in (B). JHW 007 had a mild inhibitory effect when administered alone in day 1, but values were similar to saline in session 15. JHW 007 was effective at blocking AMPH-stimulated hyperocomotion both in session 1 and session 15 (B). Values represent means \pm S.E.M. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) from control values. (#) indicates significant differences ($p < 0.05$) from AMPH values.

Fig. 3. Locomotor effects of the challenge with saline or AMPH after three weeks of withdrawal from chronic AMPH treatment. As expected, saline challenge did not produce behavioural effects in any of the experimental groups. By contrast, AMPH challenge produced a sensitized locomotor response in the chronic AMPH group, which manifested itself as a strong increase in locomotion during the first 10 min of the

session, compared with the control group that received AMPH for first time (A). The enhanced locomotor boost observed in AMPH-sensitized animals was blocked by JHW 007 pretreatment. Note that exposure to JHW 007 alone during conditioning reduced subsequent AMPH-stimulated locomotion. Mean values for the entire session are shown in (B). Values represent means \pm S.E.M. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) from control values. (#) indicates significant differences ($p < 0.05$) from AMPH values.

Fig. 4. Dendritic arborization patterns in the NAc after AMPH sensitization. Number of intersections measured by Sholl analysis was determined in 12.5 μ m dendritic fragments. The AMPH treated group showed a significantly higher number of intersections in the second ring compared with the control values, suggesting an increase in branching. Bars represent means \pm S.E.M. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) from controls.

Fig. 5. Changes in the total length and spine density in dendrites of MNS in the NAc after chronic AMPH exposure. AMPH treatment increased the average length of the dendritic tree of NAc MSNs. By contrast, JHW 007 administration did not produce any effect by itself and inhibited the increment induced by the AMPH (A). Similar effect was observed in spine density (B). AMPH enhanced the formation of new spines, and prior administration of the analog prevented this effect (B). Representative Golgi-Cox stained MSNs of the NAC and paired reconstructed tracings resized to match the photomicrographs. The images were taken with a light microscope at 40X. (C: saline, D: JHW 007, E: AMPH, F: JHW 007-AMPH). Bars represent means \pm S.E.M. (*) indicates significant differences ($p < 0.05$) from control values. (#) indicates significant differences ($p < 0.05$) from AMPH values. Scale bar, 10 μ m.

Fig. 6. Analysis of the treatment effects on the density of asymmetric synapses in the NAc. The density of the synapses increased in the AMPH treated animals compared to the saline controls. Administration of JHW 007 alone did not produce changes in synaptic density, and pretreatment with JHW007 blocked AMPH-induced increases in asymmetric synapses. Representative electron micrographs from the NAc illustrating the asymmetric synapses labelled with arrowheads (A: saline, B: JHW 007, C: AMPH, D: JHW 007-AMPH). Bars represent means \pm S.E.M. (*) indicates significant differences ($p=0.05$) from saline. Scale bar, 1 μ m.

Reference List

1. Moro H, Sato H, Ida I, Oshima A, Sakurai N, Shihara N, Horikawa Y, Mikuni M (2007) Effects of SKF-38393, a dopamine D1 receptor agonist on expression of amphetamine-induced behavioral sensitization and expression of immediate early gene arc in prefrontal cortex of rats. *Pharmacol Biochem Behav* 87:56-64
2. Shuto T, Kuroiwa M, Hamamura M, Yabuuchi K, Shimazoe T, Watanabe S, Nishi A, Yamamoto T (2006) Reversal of methamphetamine-induced behavioral sensitization by repeated administration of a dopamine D1 receptor agonist. *Neuropharmacology* 50:991-997
3. Shuto T, Seeman P, Kuroiwa M, Nishi A (2008) Repeated administration of a dopamine D1 receptor agonist reverses the increased proportions of striatal dopamine D1High and D2High receptors in methamphetamine-sensitized rats. *Eur J Neurosci* 27:2551-2557

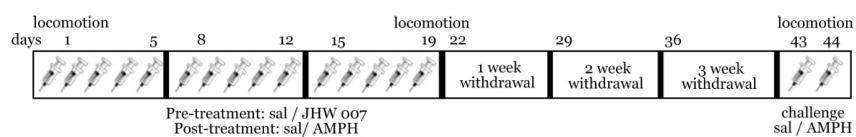


Fig. 1

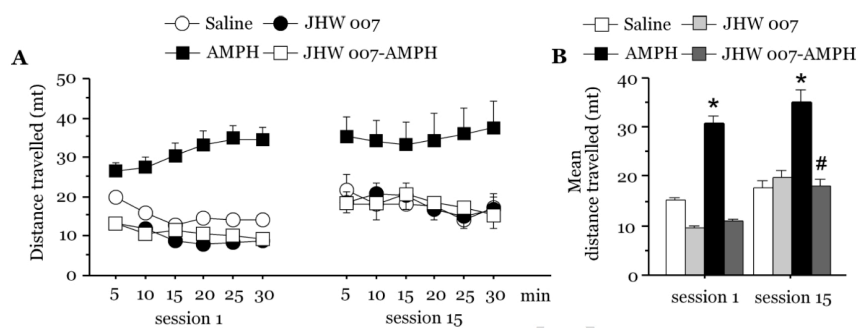


Fig. 2

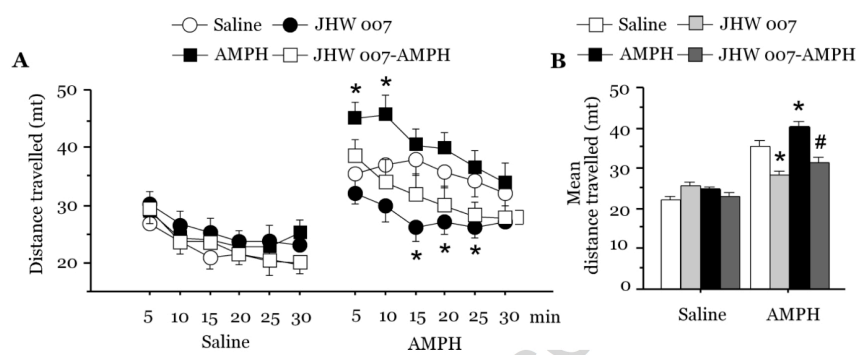


Fig. 3

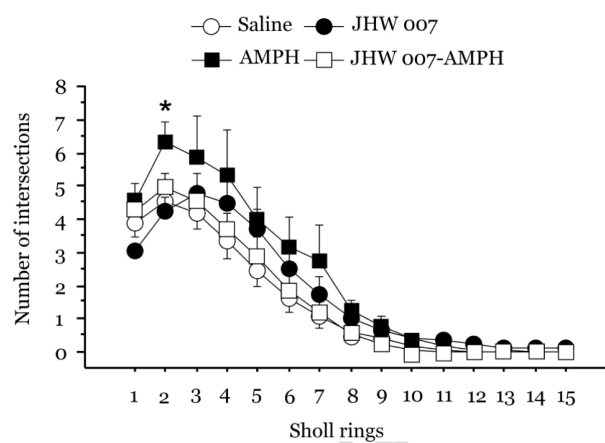


Fig. 4

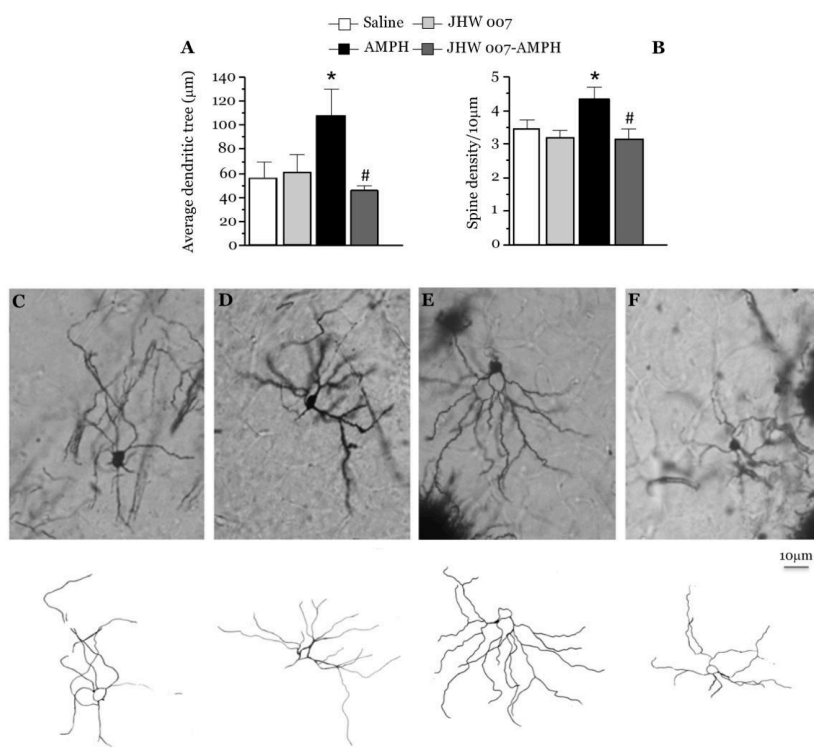


Fig. 5

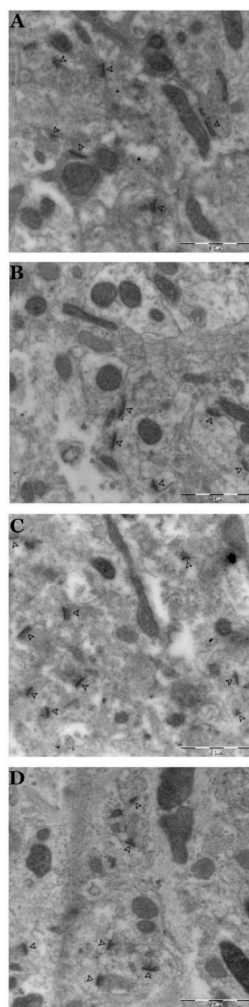
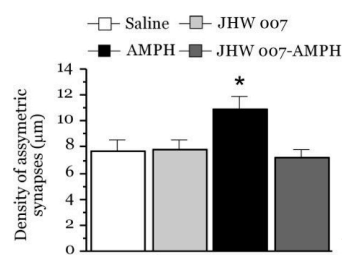


Fig. 6

Participación en otros artículos científicos

ARTÍCULO 5

“The hippocampal dentate gyrus is essential for generating contextual memories of fear and drug-induced reward”. Hernández-Rabaza V, Hontecillas-Prieto L, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Pérez-Villaba A, Arcusa A, Barcia JA, Trejo JL, Canales JJ (2008). *Neurobiology of Learning and Memory* 90, 553-9

ARTÍCULO 6

“Inhibition of adult hippocampal neurogenesis disrupts contextual learning but spares spatial working memory, long-term conditional rule retention and spatial reversal”. Hernández-Rabaza V, Llorens-Martín M, Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Arcusa A, Gumus HG, Gómez-Pinedo U, Pérez-Villalba A, Roselló J, Trejo JL, Barcia JA, Canales JJ (2009). *Neuroscience* 159(1), 59-68

ARTÍCULO 7

“A dopamine transport inhibitor with markedly low abuse liability suppresses cocaine self-administration in the rat”. Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Hernández-Rabaza V, Nácher A, Merino V, Cardá M, Murga J, Canales JJ (2009). *Psychopharmacology* 207(2):281-9

ARTÍCULO 8

“Enhanced habit-based learning and decreased neurogenesis in the adult hippocampus in a murine model of chronic social stress “. Ferragud A, Haro A, Sylvain A, Velázquez-Sánchez C, Hernández-Rabaza V, Canales JJ (2010). *Behavioural Brain Research* 210(1):134-9

ARTÍCULO 9

“Neurotoxicity and persistent cognitive deficits induced by alcohol and MDMA exposure in adolescent rats”. Hernandez-Rabaza V, Navarro-Mora G, Velazquez-Sanchez C, Ferragud A, Marin MP, Garcia-Verdugo JM, Renau-Piqueras J, Canales JJ (2010). *Addiction Biology* 15(4):413-423

ARTÍCULO 10

“Trace Amine-Associated Receptor 1 Partial Agonism Reveals Novel Paradigm for Neuropsychiatric Therapeutics“. Revel FG, Moreau JL, Gainetdinov RR, Ferragud A, Velázquez-Sánchez C, Sotnikova TD, Morairty SR, Harmeier A, Groebke Zbinden K, Norcross RD, Bradaia A, Kilduff TS, Biemans B, Pouzet B, Caron MG, Canales JJ, Wallace TL, Wettstein JG, Hoener MC (2012). *Biological psychiatry* 1;72(11):934-42.

ARTÍCULO 11

“Substituting a long-acting dopamine uptake inhibitor for cocaine prevents relapse to cocaine seeking”. Velázquez-Sánchez C, Ferragud A, Ramos-Miguel A, García-Sevilla JA, Canales JJ (2012). *Addiction Biology*. 2012 Jun 28. [Epub ahead of print].

Capítulos en libros

CAPÍTULO 1

“Basal ganglia, drug addiction and the neuroscience of maladaptive habits” Canales JJ, Ferragud A, Velázquez C, Pérez-Villalba A. (2007). In The Basal Ganglia Pathophysiology: Recent Advances, edited by G. Di Giovanni, Research Signpost.

CAPÍTULO 2

“Atypical dopamine transporter inhibitors: candidates for the treatment of psychostimulant addiction” Velázquez-Sánchez C, Canales JJ (2012). In: Emerging Targets for Drug Addiction Treatment, edited by J. J. Canales, Nova Science Publishers.

